Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg (Lahn)
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Einfluß von Myxoviren auf die Freisetzung von Wirkstoffen aus Kaninchengranulozyten

HABILITATIONSSCHRIFT
zur
Erlangung der venia legendi für das Fach
"Virologie"
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg a. d. L.

vorgelegt von

Wolfgang Pollmann

Marburg a.d.L.

1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg (Lahn)
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Einfluß von Myxoviren auf die Freisetzung von Wirkstoffen aus Kaninchengranulozyten

HABILITATIONSSCHRIFT
zur
Erlangung der venia legendi für das Fach
"Virologie"
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg a. d. L.

vorgelegt von

Wolfgang Pollmann

Marburg a.d.L.

1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A. EINLEITUNG 1

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Viruszüchtung 7

1) Influenza A PR-8 7

2) Newcastle disease Virus 7

II. Bestimmung des Haemagglutinintiters 7

III. Virusbehandlung 8

1) Wärmedenaturierung 8

2) Phenol 8

3) Iminochinon (BAYER A 139) 9

4) Äther 9

5) Trypsin 9

IV. Gewinnung der Kaninchengranulozyten 10

V. Morphologische Untersuchungen über die Penetration und Wirkung von Newcastle disease Virus bei Kaninchengranulozyten 10

1) Elektronenmikroskopische Untersuchungen 10

2) Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen 11

VI. Bestimmung der Zellatmung 11

VII. Bestimmung der Zellglykolyse 12

VIII. Messung von Enzymaktivitäten 13

1) Lipase/Esterase 13

2) Lactatdehydrogenase 14

3) Alkalische Phosphatase 14

4) Saure Phosphatase 15
5) Lysozym 15
6) Peroxydase 15
IX. Messung des Interferons 16
X. Messung des endogenen Pyrogens 16
XI. Methoden zur Isolierung und physiko-chemischen Charakterisierung des endogenen Pyrogens 17
1) Isolierung von Zellwänden und Granula der Granulozyten 17
2) Inkubationsansatz 18
3) Säulenchromatographie 19
4) Stärkegelelektrophorese 20
5) Ultrafiltration 21
6) Fällungsversuche 21
7) Versuche im Membran- und Dampfdruckosmometer 22
8) Wärmebehandlung 22
9) Chloromercuribenzoat 22
10) Mercaptoäthanol 23
11) Perjodat 23
12) Natriumdesoxycholat 23
13) Trypsin 23
14) Pepsin 23
15) Pankreaslipase 24
16) Phospholipase 24

C. ERGEBNISSE
I. Beobachtungen zur Penetration und Wirkung von Newcastle disease Virus bei Kaninchen= granulozyten 25

1) Elektronenmikroskopische Untersuchungen 25
2) Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen 26
II. Beeinflussung der Zellatmung durch:
1) Influenzavirus A PR-8 und Newcastle disease Virus 27
2) Vorbehandeltes Newcastle disease Virus 28
3) Neuraminidase 29
III. Beeinflussung der Zellglykolyse durch:
1) Influenza A PR-8 und Newcastle disease Virus 30
2) Vorbehandeltes Newcastle Virus 30
3) Neuraminidase 31
IV. Einfluß des Newcastle disease Virus auf die Enzymausschüttung der Granulozyten und Granula 32
V. Isolierung und physiko-chemische Charakterisierung des endogenen Pyrogens 37
VI. Vergleiche des physiko-chemischen Verhaltens von Granulozytenpyrogen und Interferon 46

D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 48

E. ZUSAMMENFASSUNG 58

F. LITERATUR 62

A. EINLEITUNG

Viren sind obligate Zellparasiten. Sie können deshalb vielfältige Wirkungen in lebenden Wirtszellen ausüben, wobei die Zelle häufig funktionell verändert und geschädigt wird. Der "cytopathische" Effekt kann dabei zur vollständigen Zerstörung der Zelle führen.

Die erste Voraussetzung für die Zellschädigung besteht darin, daß das Virion (145) an die Zellwand adsorbiert wird. Hierfür ist die Anwesenheit von Rezeptoren an der Zelloberfläche sowie von Ionen im Medium erforderlich (145). Das Virion wird anschließend in toto von der Wirtszelle aufgenommen. Dieser Vorgang der Endocystose verläuft als "Phagozytose" oder "Pinocytose". FAZEKAS de St. GROTH (48) hat die aktive Aufnahme des Viruspartikels durch die Zelle als "Viropexis" bezeichnet. Nur bei den Phagen stellt diese Art der Penetration eine Ausnahme dar, es wird im allgemeinen nur die Nucleinsäure in die Zelle injiziert (145). Nach TRENKNER (146) gelangt beim Bakteriophagen fd aber auch Hüllprotein in die Bakterienzelle.

Nach der Adsorption und Aufnahme durch die Wirtszelle tritt das Virion in die sogenannte Eklipse. Sein Capsid zerfällt unter Freigabe der Nucleinsäure. Die infektiöse Eigenschaft ist in dieser Phase heute mit den zur Verfügung stehenden virologischen und biologischen Methoden nicht mehr nachweisbar.

Wird die genetische Information von der Zelle realisiert, so entstehen zunächst die einzelnen Viruskomponenten,

die anschließend in der Reifungsphase zu neuen, infek=tiösen Viruspartikeln zusammengebaut werden. Schließlich erfolgt die Ausschleusung, die kontinuierlich - zum Bei=spiel bei Myxoviren (73) - oder diskontinuierlich durch Zellyse - zum Beispiel bei Polioviren (91) - ablaufen kann.

Es ist von vornherein zu erwarten, daß während der ver=schiedenen Phasen der Virussynthese und Zellschädigung Wirkstoffe verschiedenster Art in der Wirtszelle entste=hen und freigesetzt werden. Über die infizierten Körper=zellen kann damit das Virus einen vielfältigen Einfluß auf den Gesamtorganismus in physiologischer, pharmako=logischer und toxikologischer Hinsicht ausüben. Die virusinduzierten, von den Zellen gebildeten und abgege=benen Wirkstoffe sind mitverantwortlich zum Beispiel für manche Kreislaufwirkungen und Änderungen in der zellulären Zusammensetzung des Blutes, sie beeinflussen die Stoffwechselprozesse, die Infektabwehr sowie die Körpertemperatur.

Über die Auseinandersetzung von Viren und Leukozyten liegen nur wenige Untersuchungen vor, obwohl diesen Blut=zellen nicht nur eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Bakterien, sondern auch von Virusinfekten zukommen dürfte. Man weiß, daß zum Beispiel Vacciniavirus vor=nehmlich an die Leukozytenschicht des Blutes gebunden ist, was man sich diagnostisch bei der Isolierung von Pockenviren zunutze macht (61). Andere Virusarten, wie zum Beispiel Polioviren, werden von Leukozyten aufge=nommen und scheinen sich dort zu vermehren (91). Neuer=

dings hat sich herausgestellt, daß die für den Verlauf einer Virusinfektion so wichtigen Wirkstoffe Interferon und endogenes Pyrogen gemeinsam von Leukozyten produziert werden können (129).

Die nachfolgenden Untersuchungen erfolgten an dem Modell Kaninchengranulozyt/Myxovirus in vitro. Es wurden Exsudatleukozyten vom Kaninchen gewählt, weil sie sich in praktisch unbegrenzter Menge aus der Bauchhöhle gewinnen lassen und fast einheitlich bei der entsprechenden Inkubationszeit aus Granulozyten bestehen. Man kann sie als enzymatisch hochaktive Zellen relativ leicht auf verschiedenste Wirkstoffe untersuchen und sie gut reproduzierbar in einem überschaubaren System mit Viren infizieren. Von Leukozytenkulturen wurde abgesehen, weil sehr bald eine Selektion einzelner Zelltypen eintritt und die übrigen Zellen rasch degenerieren.

Als Induktoren der Wirkstoffe wurden zwei Virusarten der Myxogruppe (Influenza A PR-8 und Newcastle disease Virus) verwendet, weil sie leicht in großen Mengen züchtbar sind und sich durch einige besondere Eigenschaften, zum Beispiel Haemagglutinin, Neuraminidase und hohen Lipidgehalt, auszeichnen.

Das größte Interesse verdient die Fieberwirkung der Myxoviren, die erstmals von BENNET, WAGNER und LE QUIRE (25) nachgewiesen wurde. Bereits 2 x 10^{-7} g Influenzavirus rufen beim Kaninchen nach intravenöser Injektion deutliches Fieber hervor, das nach einer Latenzphase von 1-2 Stunden auftritt und sein Maximum nach 3-4 Stunden

erreicht. Die fieberinduzierende Eigenschaft der Myxoviren ist nicht mit den anderen Virusfunktionen wie Infektiosität, Toxizität, Interferenz oder Haemagglutinin verbunden, sondern stellt eine selbständige Qualität des Viruspartikels dar (SIEGERT und BRAUNE 132). Der pyrogene Virus-Effekt kommt - soweit erkennbar - nicht durch eine direkte Einwirkung auf das Temperaturregulationszentrum (Hypothalamus), sondern indirekt durch die Bildung eines körpereigenen, endogenen Fieberstoffes zustande (SIEGERT 133; ATKINS et al. 13), der zellulären Ursprungs ist. Über seine Herkunft bestand zunächst Unklarheit.

Die von BERTRONG und CLUFF 1953 (28) sowie von COLLINS und WOOD 1959 (36) durchgeführten Inkubationen von Kaninchenleukozyten mit Bakterienendotoxinen in vitro ergaben Hinweise dafür, daß das endogene Pyrogen aus Leukozyten stammt. Erste Versuche zur Freisetzung sekundärer Fieberstoffe in Vitro durch Einwirkung von Influenzaviren auf Kaninchen-Exsudatleukozyten von ATKINS und HUANG 1958 (12) verliefen zunächst erfolglos. Erst 1964 gelang es ATKINS et al. (15) bei einem analogen Versuch mit Parainfluenza-5-Virus und Kaninchenblut, im Überstand ein endogenes Pyrogen und damit eine direkte Viruswirkung nachzuweisen. Dieser sekundäre Fieberstoff ist zum Unterschied vom exogenen Pyrogen daran zu erkennen, daß er ohne Latenz Fieber erzeugt und als Protein wärmelabil und mit Trypsin spaltbar ist (112,130).

In diesem Zusammenhang ist es bedeutungsvoll, daß Leuko=

zyten zu denjenigen Zellen gehören, die unter Virusein=wirkung auch Interferon zu bilden vermögen. Dieser Virus=hemmstoff wird besonders stark gerade durch Myxoviren induziert (71,78). Auch bei dem Interferon handelt es sich um ein Protein, jedoch weiß man noch nicht, ob es mit dem endogenen Pyrogen identisch ist.

Noch völlig unbekannt ist der Einfluß der Myxoviren auf die Atmung und Glykolyse von Kaninchengranulozyten sowie auf die Enzymausschüttung dieser Zellen.

Da nichts darüber bekannt ist, in welcher Weise eine Auseinandersetzung zwischen Myxoviren und Kaninchengra=nulozyten stattfindet, mußte zunächst geklärt werden, ob die Viruspartikel adsorbiert und von den Zellen auf=genommen werden. Im Falle einer Virusaufnahme ist von Interesse, was dort mit den Viria geschieht, ob sie ver=vernichtet oder vermehrt werden, und wie die Wirtszelle darauf reagiert.

Ferner galt es zu prüfen,ob die Atmung und Glykolyse der weißen Blutzellen beeinflußt sowie Art und Umfang der Enzymausschüttung (Lipase/Esterase, Lactatdehydrogenase, Lysozym, saure und alkalische Phosphatase, Peroxydase) verändert werden. In diesem Zusammenhang interessiert vor allem die Frage, ob eine Beeinflussung von Zell=stoffwechsel und Enzymabgabe nicht nur durch vermeh=rungsfähige, sondern auch durch inaktivierte Virusparti=kel oder durch ihre Bausteine (Haemagglutinin, Neurami=nidase, Ribonucleinsäure) zustande kommt. Dabei war zu prüfen, ob die Induktion nicht nur über Leukozyten,

sondern auch bei daraus isolierten Granula möglich ist.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen sollten die virusinduzierte Ausschleusung von endogenem Pyrogen und Interferon aus Kaninchengranulozyten in vitro stehen und Versuche unternommen werden, beide Wirkstoffe zu isolieren, physiko-chemisch zu charakterisieren und miteinander zu vergleichen.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Viruszüchtung

1) Influenza A PR-8

Zur Züchtung wurden jeweils 0,1 ml (etwa 10^3 ID_{50}) einer Virussuspension in phosphatgepufferter, physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,2) in die Allantoishöhle 10 Tage alter Hühnerembryonen (Vorbebrütung 37°) inokuliert. Nach einer weiteren Bebrütungszeit von 25 Stunden bei 35° wurden die Eier mehrmals täglich durchleuchtet und die absterbenden Embryonen bei 4° gelagert. Nach 48 Stunden erfolgte die Entnahme der Allantoisflüssigkeit, die getrennt (jeweils die vereinigte Flüssigkeit von 2-3 Eiern) einer anaeroben und aeroben Sterilitätsprüfung sowie dem Haemagglutinationstest unterzogen wurden.

2) Newcastle disease Virus

Die Züchtung des Newcastle disease Virus (Stamm Italien) erfolgte analog der oben beschriebenen Methode. Im Gegensatz zur Gewinnung von Influenzavirus A PR-8 wurden die infizierten Bruteier bei 37° inkubiert.

II. Bestimmung des Haemagglutinintiters

Die Konzentrationsbestimmung des Virus erfolgte mit dem Mikrohaemagglutinationstest nach SEVER (126). Die Virussuspension wurde in den Vertiefungen durchsichtiger Kunststoffplatten mittels einer Platindrahtwendel mit physiologischer Kochsalzlösung schrittweise (Faktor 2) verdünnt. Zu jeder Verdünnungsstufe kamen 0,025 ml einer 1%igen, frisch gewaschenen Hühnererythrozyten-Suspension. Abgelesen wurde nach 30 Minuten bei Zimmertemperatur. Die Viruskonzentration wird in haemagglutinierenden Einheiten (HE) angegeben, bezogen auf diejenige

Verdünnungsstufe, bei der noch etwa die Hälfte der Erythrozyten agglutinierte.
Die sterilen, klaren und nichthaemolytischen Eiflüssigkeiten mit Titern über $10^{2,5}$ HE wurden sodann vereinigt, die Viruspartikel durch fraktioniertes Zentrifugieren gereinigt und dann 1 Stunde bei ca 80 000 g (Spinco) angereichert (6000 - 12 000 HE/ml).

III. Virusbehandlung

1) Wärmedenaturierung

Virussuspensionen von etwa 6000 HE/ml wurden mit 9 ml einer trisgepufferten physiologischen Kochsalzlösung (pH 7,5) unter sterilen Bedingungen im durchströmenden Wasserbad auf 56° erwärmt und nach 25 Minuten sofort im Eisbad abgekühlt. Die Erwärmung und Abkühlung erfolgten unter leichtem Schütteln.

2) Phenol

Um die Virusnucleinsäure zu gewinnen, kam die Phenolextraktion nach GIERER und SCHRAMM (60) in der abgewandelten Form von DAVIES und BARRY (40) zur Anwendung. Hierzu wurden ca 30 000 HE des Newcastle disease Virus in 20 ml trisgepuffertem, physiologischem Kochsalzmilieu (pH 7,5) mit Natriumdodecylsulfat versetzt, so daß eine 1%ige (NDS) Lösung entstand. Nach 5 Minuten bei Zimmertemperatur kam bei 4° das gleiche Volumen einer wassergesättigten Phenollösung (pH 7,5) hinzu. Das Gemisch wurde anschließend 5 Minuten bei 4° geschüttelt. Nach einer zweiten Extraktion wurden das in der wäßrigen Phase gelöste Phenol ausgeäthert, die Ribonucleinsäure zusammen mit 1 mg hochmolakularer Hefe-Ribonucleinsäure durch Zugabe des 2,5fachen Volumens an Äthanol und des 0,1fachen Volumens einer 20%igen Natriumacetatlösung ausgefällt und der Niederschlag nach 3 Stunden bei -20° gesammelt. Die Versuche erfolgten in 10 ml einer trisgepufferten physiologischen Kochsalzlösung (pH 7,5).

3) Iminochinon (BAYER A 139)

Es wurden jeweils ca 8000 HE Newcastle disease Virus zur Inaktivierung der Infektionsität (Spaltung ihrer Nucleinsäure) in 10 ml 0,1 N Tris-Maleinatpuffer (pH 6,7) mit 20 mg des Iminochinons BAYER A 139 bei 20° inkubiert. (Die neue Bezeichnung des Präparates - ein 2,5-Bis-methoxyäthoxy-3,6-bis-äthylenimino-benzochinon-1,4 - lautet BAYER E 39). Der Abbruch der Reaktion (120) erfolgte nach 14 Stunden durch eine 2 x 24stündige Dialyse gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7,5) bei 4°.

4) Äther

Die Ätherbehandlung zur Zerlegung der Viruspartikel erfolgte mit jeweils 6000 HE in 15 ml einer trisgepufferten physiologischen Kochsalzlösung (pH 7,5) durch Mischen mit dem gleichen Volumen frischdestillierten Äthers (Diäthyläther) 15 Minuten bei Zimmertemperatur im Schütteltrichter. Der in der wäßrigen Phase gelöste Äther wurde sodann am Rotationsverdampfer im Wasserstrahlvakuum bei Zimmertemperatur innerhalb von 5 Minuten entfernt.

5) Trypsin

Für jeden Ansatz wurden ca 8000 HE Virus in 10 ml einer physiologischen Kochsalzlösung am Autotitrator bei pH 7,6 mit 1 mg kristallisiertem Trypsin (SERVA, Heidelberg) 6 Stunden bei 37° behandelt. Der pH-Wert wurde hierbei mit N/100 Natronlauge unter magnetischem Rühren konstant gehalten. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation bei ca 80 000 g über 2 Stunden in der präparativen Spincozentrifuge. Um die sedimentierten Virusbestandteile zu erfassen, wurde ein Teil der behandelten Viren ohne Ultrazentrifugation direkt zu den Granulozyten gegeben.

IV. Gewinnung der Kaninchengranulozyten

Sie erfolgte unter sterilen Bedingungen durch Infusion von 350 ml einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalzlösung (mit 0,1% Stärke, 100 µg Streptomycin/ml und 100 E Penicillin/ml) unter Nembutal-Narkose (40 mg/kg) in die Peritonealhöhle des Kaninchens (3-4 kg). Bei dem Tiermaterial handelte es sich um konventionelle Tiere verschiedener Züchter. Die Haltung erfolgte in Ställen mit etwa Zimmertemperatur (20 $\pm$ 4°) sowie mit Standard-Trockenfutter/Wasser - Ernährung. Etwa 15 Stunden nach der Infusion wurden die Tiere getötet, die Granulozyten aus der Bauchhöhle mit physiologischer, heparinisierter Kochsalzlösung (100 µg Heparin-SERVA/ml) gespült und nach einmaligem Waschen durch niedertouriges Zentrifugieren bei 400 g sofort für die Untersuchungen verwendet. Die Auszählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer-Kammer. Die Ausbeute pro Tier betrug etwa 1 x 10^9 Granulozyten.

Zur Zelldifferenzierung wurden Exsudat-Ausstriche auf Objektträgern luftgetrocknet, dann für 1 Minute mit Eosin-Methylenblaulösung überschichtet, mit destilliertem Wasser abgespült und 6 Minuten mit der gleichen Lösung nachgefärbt.

V. Morphologische Untersuchungen über die Penetration und Wirkung von Newcastle disease Virus bei Kaninchengranulozyten

1) Elektronenmikroskopische Untersuchungen*)

Kaninchengranulozyten wurden in vitro bei 37° mit Newcastle disease Virus inkubiert. Das Virus/Zellverhältnis betrug hierbei etwa 1000 : 1 . Nach 1, 2, 4 und 8 Minuten wurde jeweils eine Probe entnommen und sofort mit Glutardialdehyd fixiert. Die Nachfixierung erfolgte in üblicher Weise mit Osmiumtetroxid, die Einbettung in

*) Die Aufnahmen wurden von Herrn Dr. ESSER in unserem Institut durchgeführt.

Epoxydharz ("Epon") sowie die Kontrastierung mit Uranylacetat. Zur Auswertung der Schnitte wurde das Elektronenmikroskop "Elmiskop" der Firma SIEMENS verwendet. Die Endvergrößerung betrug 100 000.

2) Phasenkontrastmirkoskopische Untersuchungen

Zu 2 ml einer Granulozytensuspension mit insgesamt etwa 7×10^7 Zellen wurden 0,15 ml einer Virussuspension (12 000 HE Newcastle disease Virus/ml) gegeben. Als Kontrolle diente der gleiche Ansatz mit 0,15 ml physiologischer Kochsalzlösung an Stelle der Virussuspension. Mit einer Platinöse wurde je 1 Tropfen auf einen mit Nähragar überzogenen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach Entfernen der überschüssigen Agarschicht mit einem Skalpel wurde das Präparat mit einem Paraffinrand abgeschlossen. Die Beobachtung der Zellen erfolgte in einem Phasenkontrastmikroskop (LEITZ) mit elektrischem Heiztisch (36,5 - 37,5°) und Fotoaufsatz. Die Vergrößerung betrug 8 x 100 (Ölimersion). Um Wärmeverluste zu vermeiden, lag das Präparat hierbei unter einer entsprechend geformten Plexiglashaube. Die Beobachtungen in Abständen von 5, 30, 60 und 120 Minuten (bzw. fotographischen Aufnahmen) erfolgten mit einer 6-Volt Lampe und dunkelgrünem Filter. Für die Aufnahmen wurde der Agfa-Film L Agepe FF verwendet; die Belichtungszeit betrug 30 Sekunden.

VI. Bestimmung der Zellatmung

Die Atmungsmessungen erfolgten im Warburg-Gerät (BRAUN, Melsungen, Modell V 85) mit Doppelkapillar-Manometern (2 x 150 mm) und geeichten Reaktionsgefäßen mit Zentralbecher (ca 14 ml). Der CO_2-Partialdruck konnte durch Zugabe von jeweils 0,4 ml Pardeepuffer (1% CO_2-Gleichgewicht) in den Zentralbecher bei den Messungen konstant gehalten werden. Hierbei wurde die Oberfläche durch Papierspiralen wesentlich vergrößert. In den Hauptraum der

Reaktionsgefäße kamen 1,6 ml der Granulozytensuspension (ca 1 x 10^8 Zellen), 0,5 ml Virussuspension (ca 2000 HE) und 0,5 ml phosphatgepufferte physiologische Kochsalz=lösung (pH 7,2). Das Gesamtvolumen betrug demnach jeweils 3,0 ml. Bei den Kontrollansätzen wurde anstelle der 0,5 ml Virussuspension 0,5 ml Kochsalzlösung zugegeben. Nach 15 Minuten Begasung mit Carbogen (5% CO_2, 95% O_2) bei 37° und einer Schüttelfrequenz von 120/Minute folgten weitere 15 Minuten mit geschlossenem Schliffhahn zur Equilibrie=rung. Erst dann wurde der Hahn an den Manometern zum Druckausgleich kurz geöffnet, wieder geschlossen und mit den Ablesungen begonnen. Die Umrechnung der Sauerstoff=partialdruck-Abnahme (mm Pardee-Lösung) in den Sauerstoff=verbrauch (µl O_2/mg Trockengewicht Granulozyten) erfolgte in üblicher Weise (148).

VII. Bestimmung der Zellglykolyse

Die Glykolysemessungen (anaerobe bzw. aerobe Milchsäure=bildung) erfolgten zunächst ebenfalls im Warburg-Gerät nach dem indirekten Verfahren (technische Einzelheiten siehe 148). Es zeigte sich aber bald, daß diese Methode unter den notwendigen physiologischen Bedingungen (pH 7,3 - 7,4) zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen führt. Dies liegt sicher daran, daß die α'/α-Kurve (Lös=lichkeitskoeffizient für CO_2) über einem pH-Wert von 7 bereits zu steil verläuft (148, Seite 32).
Zu befriedigenderen Resultaten führte dagegen die direkte Säuremethode (148, Seite 30). Hierbei wird in einem Gefäß die Atmung bestimmt, in einem zweiten Gefäß (ohne Zentralflüssigkeit Pardee bzw. KOH) durch Kippen aus einem Seitenarm 0,2 ml 30%ige Schwefelsäure zugegeben und sofort abgelesen. Diese Säurezugabe erfolgt schließ=lich in einem dritten Gefäß erst nach einstündiger Inku=bation. Als Gasphase dient jeweils Carbogen. Durch Dif=ferenzbildung läßt sich auf diese Weise die abgegebene CO_2-Menge direkt bestimmen. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, daß man nur einen Meßwert erhält. Ferner

kann nicht Bicarbonat-frei gearbeitet werden.
Es wurde daher versucht, die entstehende Milchsäure in pufferfreiem Milieu direkt zu titrieren. Die Messungen erfolgten im Autotitrator der Firma RADIOMETER, Kopenhagen. Es wurden 5 x 10^8 Granulozyten in 70 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Hinzu kamen für eine optimale Glykolyse 20 mg D-Glucose. Der auf pH 7,4 eingestellten Suspension wurden bei den Virusversuchen zusätzlich ca 6000 HE hinzugegeben. Daneben wurden stets Kontrollversuche ohne Virus durchgeführt. Die Verteilung der Zellen erfolgte bei 37° durch Magnetrührer.
Am Autotirator wurde der eingestellte pH-Wert durch N/100 Natronlauge aus einer 10 ml Feinbürette automatisch konstant gehalten. Die Lauge wurde durch Verdünnung von n/10 Titrisol-Natronlauge mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und mit N/100 Schwefelsäure laufend kontroliert. Das Bürettenvorratsgefäß war dabei durch ein Rohr mit Natriumhydroxyd-Plätzchen abgeschlossen. Die aerobe Glykolyse wurde an Luft, die anaerobe durch Begasung mit Argon (reinst) im geschlossenen System gemessen. Für die Bestimmung des pH-Wertes erwies sich die Schliffelektrode GK 2025 (RADIOMETER) am geeignetsten.

VIII. Messung von Enzymaktivitäten

1) Lipase/Esterase

Das Prinzip der Lipasenbestimmung beruht auf der Spaltung von ß-Naphthyl-laurat zu ß-Naphthol, welches mit tetrazotiertem Di-o-anisidin zu einem roten Farbstoff gekuppelt wird. 50 mg ß-Naphthol-laurat wurden in 50 ml Aceton zu einer Stammlösung gelöst und hiervon jeweils 5 ml unter starkem Rühren zu 40 ml Phosphatpuffer (0,02 M; pH 7,4) zugegeben. Hierbei mußte sich die Pipettenausflußöffnung unter der Flüssigkeitsoberfläche befinden. Es entstand eine milchige Suspension. Zur Herstellung des tetrazotierten Di-o-anisidin wurden 490 mg Di-o-anisidin mit 0,64 ml konzentrierter Schwefelsäure und 20 ml einer

kalten 1,4%igen Natriumnitritlösung bei 0° unter starkem Rühren langsam gelöst.
Zu 2 ml der zu untersuchenden Lösung kamen 5 ml der frisch bereiteten ß-Naphthyl-laurat-Suspension. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 37° erfolgte die Kupplung des freigesetzten ß-Naphthols mit 1 ml tetrazotierter Di-o-anisidinlösung. Nach einer Minute wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 40%iger Trichloressigsäure unterbrochen. Nachdem der Farbstoff mit 10 ml Essigsäureäthylester extrahiert worden war, wurden die beiden Phasen durch Zentrifugation getrennt und die Färbungen bei 540 mμ gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Gleichzeitig wurde mit reinem ß-Naphthol p.a. eine Eichkurve aufgestellt. Wie die Abbildung 1 zeigt, bestand eine lineare Beziehung zur Extinktion (E_{540} 1,00 = 31,7 μg ß-Naphthol). In Anlehnung an die Arbeiten von SELIGMAN und NACHLAS (125) wurde eine Lipase/Esterase-Einheit als diejenige Enzymmenge definiert, welche bei 37° in 5 Stunden 0,01 mg ß-Naphthol aus ß-Naphthyl-laurat in Freiheit setzt.

2) Lactatdehydrogenase

Die Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH) erfolgte mittels der Biochemica Test-Combination TC-G I, 15977 (BOEHRINGER, Mannheim). 0,1 ml der zu untersuchenden Lösung wurde mit 3,0 ml 0,05 m Phosphatpuffer (pH 7,5), 0,0003 m Pyruvat sowie mit 0,05 ml 0,009 m reduziertem Diphosphopyridinnucleotid (DPNH) bei 25° gemischt. Die Messung der Extinktion bei 366 mu erfolgte 4-5 mal in Zeitabständen von 1 Minute. Aus den Extinktionsdifferenzen wurde sodann das Mittel berechnet und mit dem Umrechnungsfaktor 9550 für die Internationale Einheit multipliziert. Hieraus ergab sich die LDH-Aktivität in Millieinheiten (m.U.) pro ml Lösung.

3) Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase ist durch die Hydrolyse von Natrium-p-nitrophenylphosphat nach der Biochemica Test-

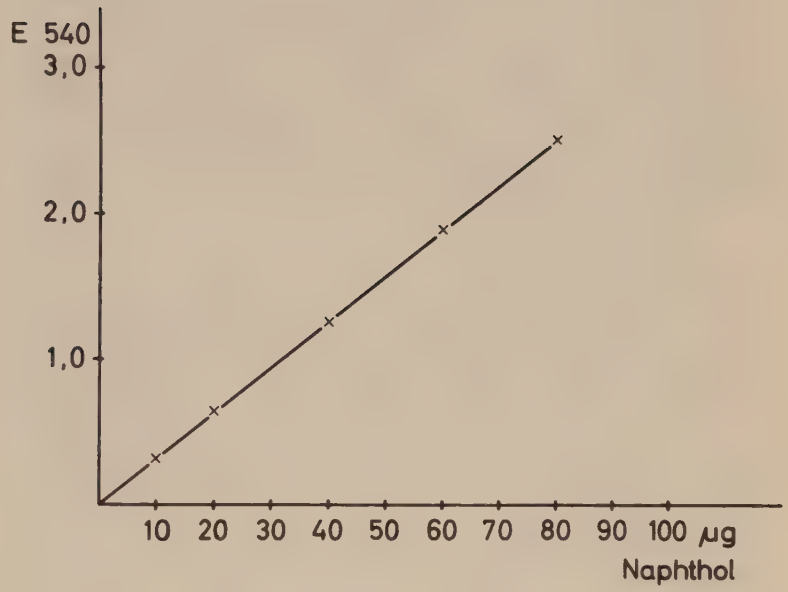

Abbildung 1 : Eichkurve zur Lipase/Esterase-Bestimmung
Aufgetragen wurde die eingewogene ß-Naphtholmenge in µg gegen die gefundene Extinktion bei 540 mµ .

Combination TC-P, 15987 bestimmt worden, 0,1 ml der Lösung wurde mit 1 ml einer Mischung von 0,05 m Glycinpuffer (pH 10,5), 0,0005 m $MgCL_2$ sowie 0,0055 m Natrium-p-phenylphosphat 30 Minuten bei 37° in Wasserbad inkubiert. Hierauf kamen zu jedem Ansatz 10 ml einer 0,08%igen Natronlauge. Die Extinktionen wurden bei 405 mμ im Zeiss-Spektralphotometer QM II gegen einen Reagenzienleerwert bestimmt. Der Umrechnungsfaktor in Millieinheiten (m.U.) pro Milliliter betrug 200.

4) Saure Phosphatase

Die Aktivität der sauren Phosphatase wurde mit 0,2 ml der zu untersuchenden Lösung und 1 ml einer Mischung von 0,05 M Citratpuffer (pH 4,8) sowie 0,0055 M Natrium-p-nitrophenylphosphat (Test-Combination TC-Q 15988) nach 30 Minuten bei 37° im Wasserbad bestimmt. Der weitere Gang der Messung erfolgte wie bei der alkalischen Phosphatase. Der Umrechnungsfaktor in mU/ml (milli Units) betrug hierbei 100.

5) Lysozym

Die Bestimmung der Lysozymaktivität erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von SMOLELIS und HARTSELL (139). In einer M/15 Phosphatpufferlösung (pH 6,2) wurde eine Micrococcus-Lysodeicticus-Suspension angesetzt, sodaß bei 540 mμ gegen Wasser eine Lichtdurchlässigkeit D von 20 % bestand. Gegenüber der Literaturangabe von 10 % erwies sich hierbei die Bakteriensuspension (BOEHRINGER, Mannheim) als stabiler. 0,2 ml der Probe wurden jeweils mit 2,5 ml der Suspension gemischt und bei 540 mμ gemessen. Die Reaktionszeit betrug 20 Minuten bei 20°.
In der Abbildung 2 ist die für die beschriebenen Reaktionsbedingungen ermittelte Eichkurve dargestellt.

6) Peroxydase

Die Messung der Peroxydase wurde durch die Oxydation von p-Phenylendiamin mit Wasserstoffperoxyd bestimmt. 1 ml

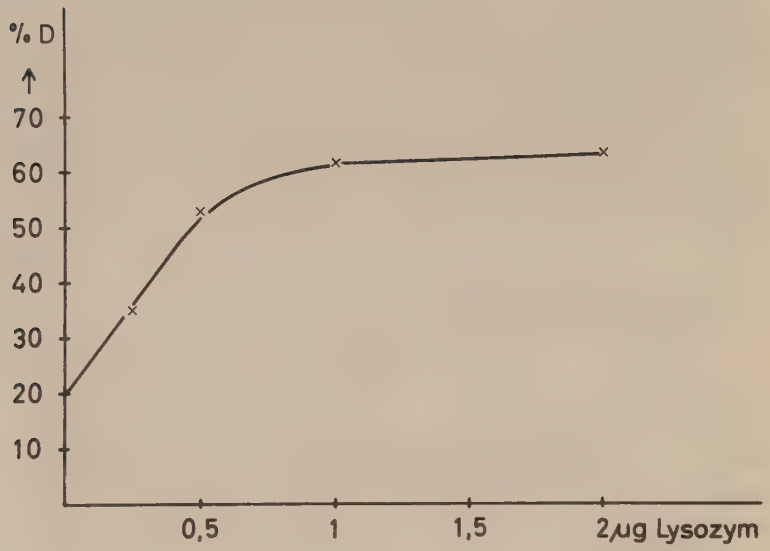

Abbildung 2 : Eichkurve zur Lysozym-Bestimmung

Aufgetragen wurde die eingewogene Lysozymmenge in µg gegen die gefundene Lichtdurchlässigkeit bei 540 mµ .

der Probe wurde mit 2 ml M/15 Phosphatpuffer (pH 7,0) und 0,1 ml einer 1%igen p-Phenylendiaminlösung (farblos!) gemischt und dann mit 0,1 ml einer 0,003 molaren H_2O_2-Lösung versetzt. Hierauf ist sofort die Extinktionszunahme bei 485 mμ und Zimmertemperatur in Abständen von 5 Minuten ermittelt worden. Bei dem Reagenzienleerwert fand destilliertes Wasser statt H_2O_2 Verwendung.
Bei der Herstellung der p-Phenylendiaminlösung war neben der großen Toxizität zu beachten, daß frisch sublimierte Substanz unter Sauerstoff- und Lichtausschluß in heißem destillierten Wasser gelöst wurde.

IX. Messung des Interferons

Die Bestimmung des Interferons*) erfolgte durch Hemmung des cytopathischen Effekts (CPE) eines Testvirus. Die zu untersuchende Interferonverdünnung wurde auf Kaninchennierenzellkulturen in Rollrandröhrchen gegeben (je 1 ml in physiologischer Kochsalzlösung) und nach 24 Stunden mit Erhaltungsmedium abgespült. Als Testvirus wurden pro Zellkultur sodann etwa 1000 ID_{50} des Vesikular Stomatitis Virus (VSV) zugegeben. Nach 48 Stunden bei 37° erfolgte die Ablesung der Ergebnisse bei 10facher Vergrößerung.

X. Messung des endogenen Pyrogens

Die Pyrogenitätsmessungen erfolgten durch intravenöse Injektion von 1 - 10 ml der zu testenden Lösung (je nach vorangegangener Konzentrierung) in die Ohrrandvene von jeweils 2 - 4 Kaninchen. Bei den Tieren handelte es sich um konventionelles Material verschiedener Züchter mit einem Gewicht von 2 - 2,5 kg. Das Futter bestand aus Standard-Trockenfutter/Wasser. Der Stall hatte eine Temperatur von 20° ± 4°. Die Messung der Körpertemperatur erfolgte rektal mittels Widerstandsthermo-

*) Freundlicherweise von Herrn Dr. KOHLHAGE in unserem Institut durchgeführt.

meter, Sonde und Schreiber (HARTMANN & BRAUN, Frankfurt). Außer der maximalen Temperaturerhöhung in ^{o}C wurde für quantitative Vergleiche jeweils der sogenannte Fieberindex (FI) für die Zeit von 60 bzw. 120 Minuten nach der Injektion bestimmt. Hierfür wurde das Planimeter der Firma OTT verwendet. Es handelt sich bei den Messungen um die Ermittlung der Fläche, die von der Basislinie und der Fieberkurve begrenzt wird, ausgedrückt in cm^2 bei einer bestimmten Papiervorschubgeschwindigkeit und Schreiberempfindlichkeit. Für einen Vergleich des Index mit amerikanischen Angaben (9) (1^{o} Ausschlag am Gerät = 1 inch, 1 Stunde Papiervorschub = 1,2 inch) ergab sich für unsere Versuchsanordnung (1^{o} Ausschlag = 1,2 cm, 1 Stunde Papiervorschub = 2 cm) ein Umrechnungsfaktor von 3,2.
Alle Spritzen, Nadeln und Glasgeräte waren 1 Stunde bei 180^{o} sterilisiert worden. Alle Lösungen waren bakteriell (aerob und anaerob) steril und apyrogen.

XII. Methoden zur Isolierung und physiko-chemischen Charakterisierung des endogenen Pyrogens

1) Isolierung von Zellwänden und Granula der Granulozyten

Zur Gewinnung der Granulozytenzellwände wurden 2×10^{9} Zellen in 100 ml destilliertem Wasser 1 Stunde bei Zimmertemperatur suspendiert. Die Verteilung der Zellen erfolgte dabei mittels Magnetrührer. Die 15 Minuten bei 5000g abzentrifugierten Zellwände wurden anschließend mit destilliertem Wasser sowie phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, abzentrifugiert (15 Minuten bei 5000 g) und in 20 ml der gepufferten Kochsalzlösung aufgenommen.
Die Zellwände wurden durch Ultraschallbehandlung mit dem Gerät "MOLLARD Equipment, 7680/3, 55 W" bei 4^{o} in 5 Minuten gewonnen. Anschließend wurde das Zellmaterial abzentrifugiert, mit gepufferter Kochsalzlösung, wie oben beschrieben, gewaschen und ebenfalls in 20 ml Kochsalzlösung suspendiert. Die Ausgangsmenge der Zellen betrug wiederum 2×10^{9} Granulozyten.

Die Isolierung und Charakterisierung der Granulozytengranula erfolgten nach den Angaben von COHN und HIRSCH (34). Es wurden jeweils etwa 1 x 10^9 Kaninchengranleukozyten bei 0^o in 50 ml 0,34 M Sucroselösung (Saccharose) suspensiert und sofort bei 2500 g in 5 Minuten wieder sedimentiert. Hiernach wurden erneut 50 ml der Sucroselösung zu dem Sediment gegeben, die Zellen im Potter-Glashomogenisator bei 0^o (2 Minuten) dispergiert. Die groben Zelltrümmer der stark trüben Lösung bei 4000 g (10 Minuten) abzentrifugiert. Die Gewinnung der Granulafraktion erfolgte durch anschließendes Abschleudern bei 8200 g (20 Minuten). Die fraktionierte Zentrifugation wurde wiederholt. Untersuchungen im Phasenkontrastmikroskop ergaben, daß keine intakten Zellen oder größere Anteile an Zelltrümmern mehr vorhanden waren.

2) Inkubationsansatz

Zur Gewinnung des virusinduzierten endogenen Pyrogens wurden je Ansatz 1 x 10^9 Kaninchengranulozyten in 80 ml physiologischer Kochsalzlösung am Autotitrator bei pH 7,4 und 37^o mit ca 10 000 HE Virus 3 Stunden inkubiert. Als Vergleich diente ein entsprechender Leukozytenansatz ohne Viruszugabe. Die durch die Glykolyse der Zellen bedingte Verschiebung des pH-Wertes wurde automatisch mit N/100 Natronlauge über ein Magnetventil laufend ausgeglichen. Sämtliche Handhabungen sind unter sterilen Bedingungen durchgeführt worden. Nach beendeter Inkubation erfolgten eine Vorzentrifugation bei 8000 g und eine Ultrazentrifugation bei 80 000 g in der präparativen Spincozentrifuge. Der klare Überstand wurde hierauf im Hämagglutinationstest auf eventuell noch vorhandenes Virushaemagglutinin geprüft. Nach einstündiger Ultrazentrifugation lag der Hämagglutinintiter im Überstand stets unter 4. Gleichzeitig wurde die Sterilität der Lösung nochmals aerob sowie anaerob kontrolliert.
Die Inkubation der Zellwände oder der Granula erfolgte analog zu den Versuchen mit den Gesamtzellen: Zellwände bzw. Granula von 5 x 10^8 Granulozyten wurden 1 Stunde bei 40^o bzw. 2 Stunden bei 37^o mit und ohne Newcastle disease Virus (6000 HE) unter sterilen, apyrogenen Bedingungen und magne-

tischem Rühren inkubiert. Hiernach erfolgte eine einstündige Ultrazentrifugation (Spinco) bei 80 000 g. Jeweils 5 ml des Überstandes wurden im Kaninchentest auf ihre Pyrogenität untersucht.

3) Säulenchromatographie

Für die säulenchromatographische Trennung und Reinigung des endogenen Pyrogens im Zellüberstand wurden die Dextrangeltypen der Sephadexreihe (PHARMACIA, Schweden) G-25, G-50, G-100 und G-200 sowie die Polyacrylamidgeltypen der Biogelreihe (BIO-RAD, USA) P-30, P-60 und P-100 verwendet. Die Auftrennungen erfolgten in Glassäulen (60 x 3 cm) mit Kühlmantel bei 4° in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Teilweise wurden auch Säulen der Abmessung 150 x 3 cm benutzt. Vor einer säulenchromatographischen Auftrennung einer Probe (5-20 ml, je nach Höhe des Fieberindex) wurden 2 x 10 ml des Säuleneluates im Kaninchentest auf Freisein von Pyrogen geprüft. Erwies sich in einigen Fällen die Säulenfüllung als pyrogen oder bakteriell unsteril, so wurde die Säule mit je 1 l der folgenden Lösungen - welche ihrerseits natürlich apyrogen sein mußten - in der angegebenen Reihenfolge behandelt: 1%ige Phenollösung, physiologische Kochsalzlösung, bei 4° an Kaliumperjodat gesättigte physiologische Kochsalzlösung (nur bei den Biogeltypen) sowie erneut physiologische Kochsalzlösung. Aus Gründen der Apyrogenität und Sterilität mußte für diese Versuche ein neuartiger Fraktionssammler entwickelt werden (109). Mit den im Handel befindlichen Geräten gelang es uns nicht, die chromatographischen Trennungen steril und apyrogen durchzuführen. Der beschriebene Fraktionssammler (Abbildung 3) wird inzwischen von der Firma B.BRAUN, Apparatebau, Melsungen, in Lizenz hergestellt.

Das Schlauchende der Säule endet hierbei in einem elastischen Plättchen, das in einem Schlitten mit konstanter Geschwindigkeit über eine Kunststoffverteilerplatte geführt wird. Die Verteilerplatte ist mit insgesamt 102 Rinnen versehen, die das Eluat seitlich in darunterstehende Reagenzgläser leiten. Der Schlitten wird dabei durch eine Gewindespindel mittels Synchronmotor und 10-Gang-Getriebe bewegt.

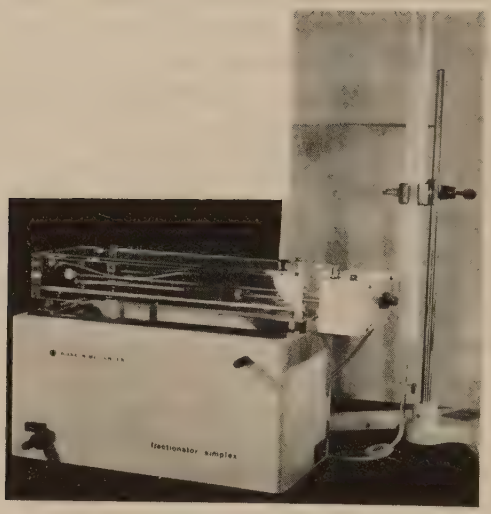

Abbildung 3 : Fraktionssammler für sterile und apyrogene Bedingungen

Lizenz: Firma B.BRAUN, Melsungen "fractionator simplex"

Schlitten, Spindel und Verteilerplatte sind durch eine Plexiglashaube abgeschlossen. Es ergibt sich hieraus ein kompaktes, völlig geschlossenes System. Während der Säulenchromatographie werden die Säulenfüllung und die Auffanggläser durch Sole gekühlt. Mit Hilfe der beschriebenen Versuchsanordnung gelang es, das endogene Pyrogen unter sterilen und apyrogenen Bedingungen abzutrennen.
Die Registrierung der Extinktionskurve des Eluates erfolgte im LKB-Uvicord bei 254 mμ. Als Eichsubstanzen zur Molekulargewichtsbestimmung (72) wurden Blue Dextran 2000 (Molekulargewicht etwa 2 Mȯll.) der Firma PHARMACIA, Schweden, Kaninchen-Hämoglobin (M = 68 000, Eigenherstellung) sowie die kristallisierten Substanzen Pepsin (M = 35 000), Ribonuclease (M = 15 000) und Phenylalanin (M = 165) der Firma SERVA, Heidelberg, aufgetragen.

4) Stärkegelelektrophorese

Analog zur säulenchromatographischen Auftrennung des endogenen Pyrogens trat auch bei der elektrophoretischen Isolierung das Problem der sterilen und apyrogenen Durchführung der Versuche auf. Zusammen mit KOHLHAGE aus unserem Institut wurde die Stärkegelelektrophorese nach SMITHIES so abgewandelt, daß sich ein abgeschlossener, sterilisierbarer Raum ergibt. Hierzu wurde ein mit Planschliffen versehenes Rohr an einem Ende mit einer VISKING-Membran verschlossen und unter sterilen Bedingungen eine warme, entgaste 10%ige Stärkegellösung eingefüllt. Auf die Gellösung wurde sodann die zu untersuchende Probe in Form eines getränkten Filterplättchens oder Glasfritte aufgebracht, erneut Stärkegel aufgetragen, und dann das obere Ende der Säule ebenfalls mit einer Membran verschlossen. Die beiden Elektrodengefäße wurden nun mit 0,05 Trispuffer, pH 9,2 gefüllt und an die Platinelektroden eine Gleichspannung von 270 V angelegt. Die Stromstärke betrug hierbei 2-3 mA. Die Kühlung erfolgte mit einer 4° Sole (Abbildung 4). Abbildung 5 zeigt als Beispiel die Auftrennung von Humanserum, Färbung mit Amidoschwarz 10 B.

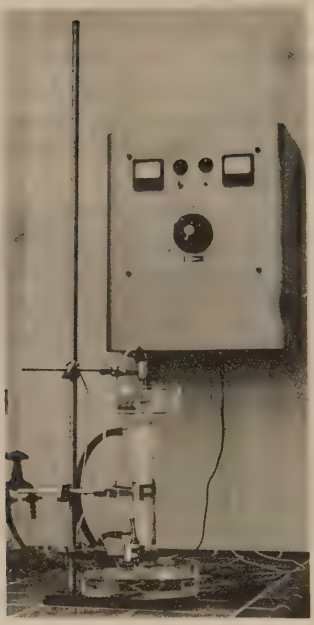

Abbildung 4 : Vertikale Elektrophorese in der Stärkegelsäule

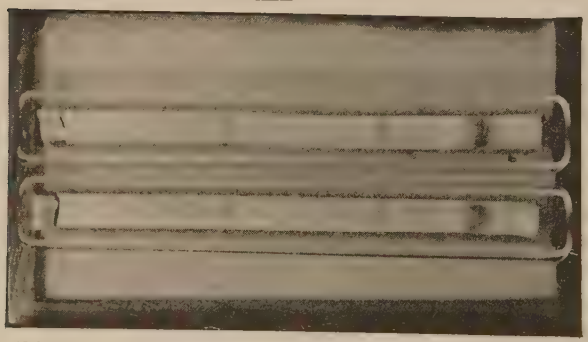

Abbildung 5 : Beispiel einer Proteinauftrennung

Kaninchen-Normalserum, Färbung: Amidoschwarz 10 B .

5) Ultrafiltration

Zur Konzentrierung sowie zur weiteren Ermittlung des Molekulargewichtes wurde die Lösung des endogenen Pyrogens verschiedenen Ultrafiltrationen unterworfen. Zur Verwendung kamen das Druckgerät der MEMBRANFILTERGESELLSCHAFT, Göttingen, mit reinstem Stickstoff als Treibgas bei etwa 5 Atmosphären und Membranen der gleichen Firma mit verschiedenen Porenweiten (z.B. Lsg.60). Ferner wurde das LKB-Ultrafilter (Schweden) benutzt. Hier wird ein Dialyseschlauch durch einen Nylonzylinder soweit abgestützt, daß die Membran einem angelegten Wasserstrahlvakuum standhält.
Sämtliche Teile wurden vor der Ultrafiltration in destilliertem Wasser 10 Minuten gekocht. Die Membranen der MEMBRANFILTERGESELLSCHAFT werden bereits steril verpackt geliefert. Blindversuche mit physiologischer Kochsalzlösung ergaben im anschließenden Kaninchen-Pyrogentest, daß während der Filtration keine bakteriellen Verunreinigungen eingetreten waren.

5) Fällungsversuche

Zu einem Volumenteil Pyrogenlösung kam unter Rühren das gleiche Volumen einer bei 40° gesättigten Ammoniumsulfatlösung. Nach einer Stunde bei 4° wurde das Präzipitat bei 800 g abzentrifugiert und in dem ursprünglichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,4) gelöst.
Zu einer mittels Ultrafiltration auf 1/10 eingeengten Pyrogenlösung wurden bei 0° langsam unter Rühren soviele ml einer 60%igen Perchlorsäure zugegeben, bis die Lösung hieran 0,3 molar war. Der Niederschlag wurde bei 800 g abzentrifugiert und im ursprünglichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.
Für die Versuche zur fraktionierten Pyrogenfällung sind jeweils 20 ml eines 1:5 Pyrogenkonzentrates schrittweise bei 0° mit kaltem Äthanol p.a. versetzt worden, so daß die Konzentrationsstufen 17 %, 45 %, 62 % und 74 % an Äthanol entstanden. Die einzelnen Niederschläge wurden vor einer erneuten Alkoholzugabe bei 800 g abzentrifugiert und in 10 ml

einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalzlösung aufgenommen.

6) Versuche im Membran- und Dampfdruckosmometer

Die Untersuchungen zur genaueren Molekulargewichtsbestimmung des virusinduzierten endogenen Pyrogens wurden zunächst im Mechrolab Dampfdruck-Osmometer der Firma KIPP & ZONEN durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 37° mittels der thermoelektrischen Bestimmung kleinster Temperaturunterschiede zwischen Probe- und reinem Lösungsmitteltropfen. Die Genauigkeit war zu 0,0001° angegeben.
Da mit dem Dampfdruckosmometer eine Molekulargewichtsbestimmung nur bis etwa 20 000 (hier bereits 10 % Fehler) möglich ist, wurden die Versuche mit dem Membran-Osmometer derselben Firma fortgeführt: Eine auf 25° thermostatisierte Meßkammer enthält eine Membran, unterhalb der sich das Lösungsmittel, oberhalb die Probelösung (1 ml) befindet. Sobald ein kleiner Lösungsmittelstrom durch den osmotischen Druck einsetzt, wird ein kommunizierendes Außengefäß mittels eines optischen Detektors und eines Servomotors soweit angehoben, daß der Lösungsmittelstrom zum Stillstand kommt. Der osmotische Druck wird direkt an einem Zählwerk abgelesen.

7) Wärmebehandlung

5 ml der 1:5 konzentrierten Lösung wurden zusammen mit 5 ml einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalzlösung (pH 7,4) 30 Minuten auf 95° gehalten und anschließend sofort im Eisbad abgekühlt. Erwärmung und Abkühlung erfolgten unter schwachem Schütteln.

8) Chloromercuribenzoat

4 ml eines Pyrogenkonzentrats (1:5) wurden mit 5 ml Trispuffer (0,15 M; pH 8,0) und 1 mg p-Chloromercuribenzoat p.a. 30 Minuten bei 4° stehengelassen und anschließend 1 Stunde bei 0° gegen 1 l physiologischer Kochsalzlösung dialysiert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne p-Chloromercuribenzoat sowie ohne Pyrogen.

9) 2-Mercaptoäthanol

4 ml der konzentrierten Pyrogenlösung (1:5) wurden mit 5 ml Trispuffer (0,15 M; pH 8,0) und 0,08 ml 2-Mercaptoäthanol p.a. 60 Minuten bei 37° inkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Dialyse bei 0° gegen 1 l physiologische Kochsalz=lösung. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Mercaptoäthanol bzw. ohne Pyrogen.

10) Perjodat

Eine Mischung von 5 ml Pyrogenkonzentrat (1:5), 4 ml Natrium=acetatpuffer (0,15 M; pH 5,0) sowie 1 ml einer 0,04 molaren Kaliumperjodatlösung wurde 4 Stunden bei 4° stehengelassen. Anschließend erfolgte eine einstündige Dialyse gegen 1 l einer phosphatgepufferten (0,03 M; pH 7,4) physiologischen Kochsalzlösung bei 0°. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Kaliumperjodat bzw. ohne Pyrogen.

11) Natriumdesoxycholat

5 ml eines Pyrogenkonzentrats (1:5) wurden mit 5 ml Trispuf=fer (0,15 M; pH 7,) und 200 mg Natriumdesoxycholat 30 Mi=nuten bei 20° stehengelassen und anschließend bei 4° für 24 Stunden gegen 2 l physiologischer Kochsalzlösung dialysiert. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge von endogenem Pyrogen ohne Natriumdesoxycholat ebenfalls 24 Stunden dialysiert.

12) Trypsin

5 ml der konzentrierten Pyrogenlösung (1:5) wurden zusammen mit 5 ml Trislösung (0,15 M; pH 8,0) und 1 mg kristallisier=tem Trypsin (SERVA, Heidelberg) 4 Stunden bei 37° inkubiert. Als Kontrollen dienten wiederum Ansätze ohne Trypsin bzw. ohne Pyrogen.

13) Pepsin

5 ml eines Pyrogenkonzentrates (1:5) wurden mit 1 mg kri=stallisiertem Pepsin (SERVA, Heidelberg) und 5 ml Natrium=acetatpuffer (0,15 M; pH 3,5) 4 Stunden bei 37° inkubiert.

Hiernach wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Als Kontrol=len lief je ein Versuch ohne Enzym sowie ohne Pyrogen mit.

14) Pankreaslipase

5 ml der konzentrierten Pyrogenlösung (1:5) wurden mit 5 ml Trispuffer (0,15 M; pH 8,0) und 1 mg Pankreaslipase (SERVA, Heidelberg) 1 Stunde bei 37° inkubiert. Als Kontrollen dien=ten Ansätze ohne Lipase bzw. ohne Pyrogen.

15) Phospholipase A

5 ml eines Pyrogenkonzentrates (1:5) wurden mit 5 ml Tris=puffer (0,15 M; pH 8,0) und 150 µg Phospholipase A (BOEH=RINGER, Mannheim) 1 Stunde bei 37° inkubiert. Als Kontrollen wurden jeweils ein Versuch ohne Enzym sowie ohne Pyrogen mitgeführt.

C. ERGEBNISSE

I. Beobachtungen zur Penetration von Newcastle disease Virus bei Kaninchengranulozyten

1) Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Eine Induktion von endogenem Pyrogen, Interferon oder anderen Wirkstoffen ist ohne Reaktion zwischen Virus und Zelle nicht denkbar. Beide müssen hierbei in räumliche Beziehungen treten. Es ist nichts darüber bekannt, wie und in welcher Zeit Myxoviren in Kaninchengranulozyten aufgenommen werden, was mit ihnen dort geschieht und wie sie die Wirtszellen beeinflussen.

Wie SHU (128) aus unserem Arbeitskreis gezeigt hat, kommt es unter den gegebenen Versuchsbedingungen weder intra- noch extrazellulär zu einer Zunahme der Infektions- und Haemagglutinintiter. Vielmehr nehmen Infektiosität und Haemagglutinin allmählich ab. Es kann sich deshalb nur darum handeln, daß die Viren adsorbiert werden, penetrieren und durch Zellenzyme abgebaut werden. Diese Stadien werden bei jeder Zellinfektion durchlaufen, jedoch bleibt die anschließende Synthesephase aus.

Die Adsorption, Penetration und Eklipse sind elektronenmikroskopisch am Beispiel des Newcastle disease Virus untersucht worden. Die Viruspartikel wurden bereits in 1-2 Minuten an die Zellwand gebunden (Abbildung 6), dann in Form einer "Pinocytose" oder "Phagocytose" in toto aufgenommen (Abbildungen 7 und 8), entsprechend der von FAZEKAS de St. GROTH beschriebenen "Viropexis".

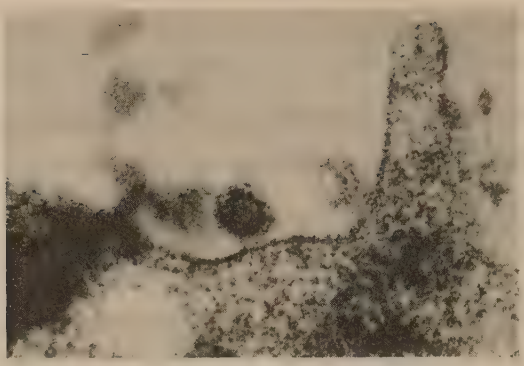

Abbildung 6 : Adsorption von Newcastle disease Virus an die Granulozytenmembran

(Elektronenmikroskopische Aufnahme, 100 000fach)

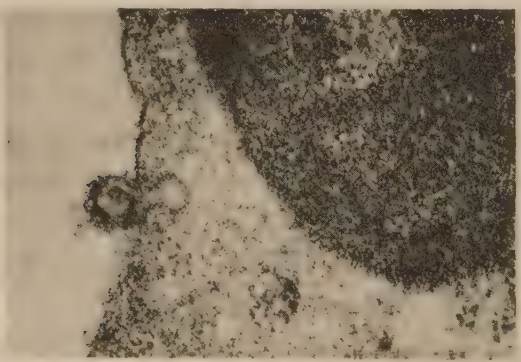

Abbildung 7 : Beginnende Endozystose eines Viruspartikels (Viropexis) durch die Granulozytenmembran

(Elektronenmikroskopische Aufnahme, 100 000fach)

Abbildung 8 : Fortgeschrittene Endozystose eines Viruspartikels durch einen Granulozyten
(Elektronenmikroskopische Aufnahme, 100 000fach)

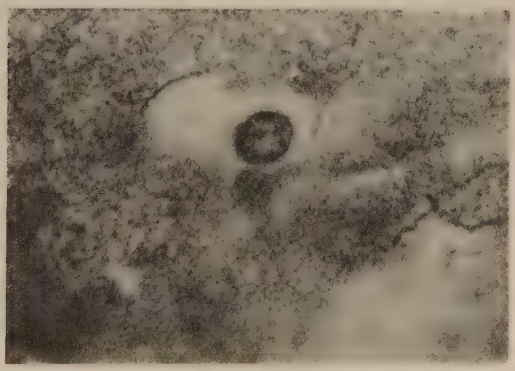

Abbildung 9 : Viruspartikel in einer Granulozytenvakuole
(Elektronenmikroskopische Aufnahme, 100 000fach)

Die Viruspartikel lagen bereits nach 3 Minuten in intra= zytoplasmatischen Vakuolen (Abbildung 9) vor. Man hat den Eindruck, daß sich sehr bald ihre Konturen verwischen und sie abgebaut werden (Abbildung 10). Auch elektronenmikro= skopisch fand sich kein Hinweis für eine Virusvermehrung von Newcastle disease Virus in Kaninchengranulozyten.

2) Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen

In weiteren Versuchsreihen wurde im Phasenkontrastmikroskop untersucht, ob sich bei der Einwirkung von Newcastle dis= ease Virus morphologische Veränderungen am Kaninchengranu= lozyten erkennen lassen. In Abbildung 11 ist eine Zellgruppe direkt nach Zugabe von Newcastle disease Virus dargestellt. Eine Stunde später (Abbildung 12) machen die Zellen einen geschädigten Eindruck und sind teilweise lysiert. Die Zahl der Granula scheint dabei abzunehmen. Als Kontrolle sind in den Abbildungen 13 und 14 Zellen ohne Virus, ebenfalls im Abstand von 1 Stunde, abgebildet. Eine nennenswerte Zell= schädigung ist hier nicht zu erkennen. Das Newcastle disease Virus bewirkt demnach bei Kaninchengranulozyten trotz Aus= bleibens einer Vermehrung einen cytopathischen Effekt.

Als Beispiel für die Schnelligkeit der Schädigung seien die Abbildungen 15 und 16 angeführt. Bereits nach einer Einwirkungszeit der Viren von 5 Minuten (Abbildung 16) zeig= ten die Zellen Zerfallserscheinungen. In einem Kontrollansatz ohne Virus konnten keine morphologischen Veränderungen nach= gewiesen werden. Das Virus/Zell-Verhältnis betrug bei 7×10^7 Zellen und 180 HE etwa 250:1. Massenmäßig gesehen

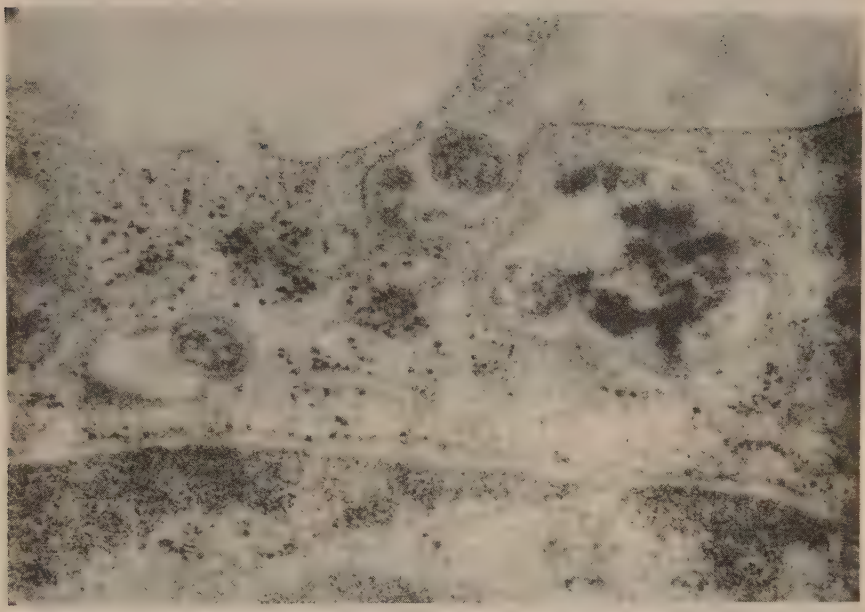

Abbildung 10 : Beginnende Auflösung der Viruspartikel in den Vakuolen

(Elektronenmikroskopische Aufnahme, 100 000fach)

Abbildung 11 : Kaninchengranulozyten mit Newcastle disease Virus

(Zeit:"0"; Phasenkontrastmikroskop, 800fach)

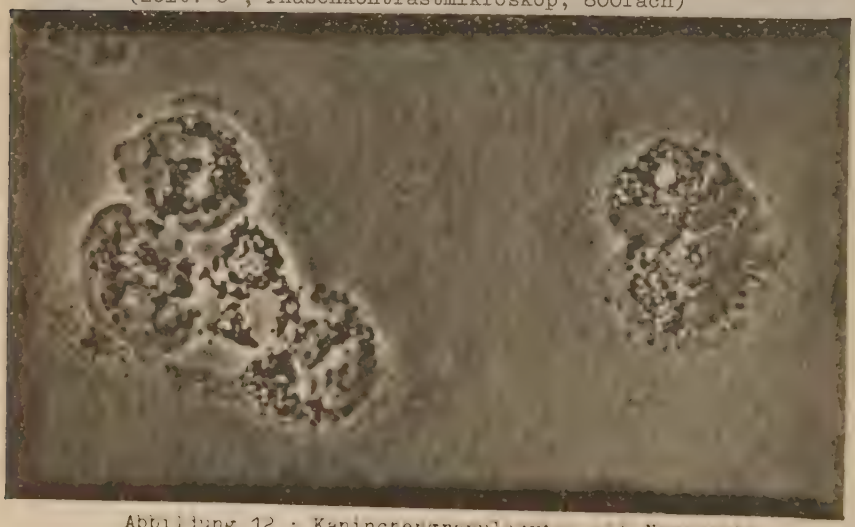

Abbildung 12 : Kaninchengranulozyten mit Newcastle disease Virus

(Zeit: 60 Minuten,37°; Phasenkontrastmikroskop,800fach)

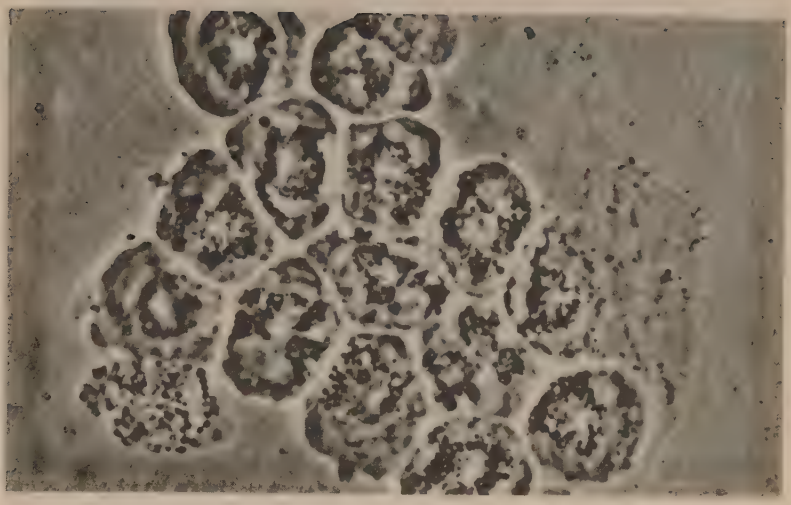

Abbildung 13 : Kaninchengranulozyten ohne Newcastle disease Virus

(Zeit:"0"; Phasenkontrastmikroskop, 800fach)

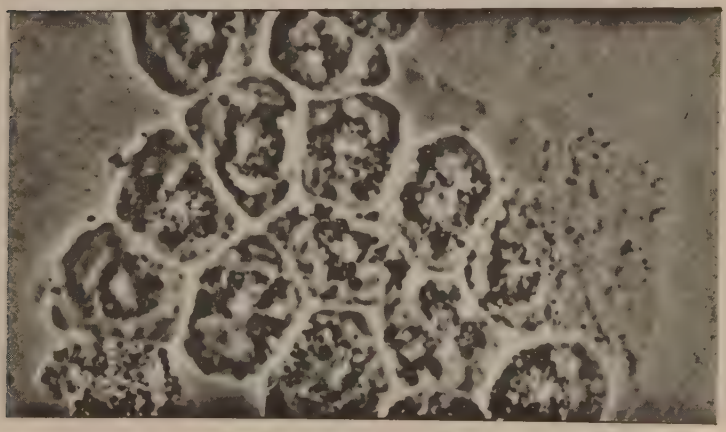

Abbildung 14 : Kaninchengranulozyten ohne Newcastle disease Virus

(Zeit: 60 Minuten, 37°; Phasenkontrastmikroskop, 800fach)

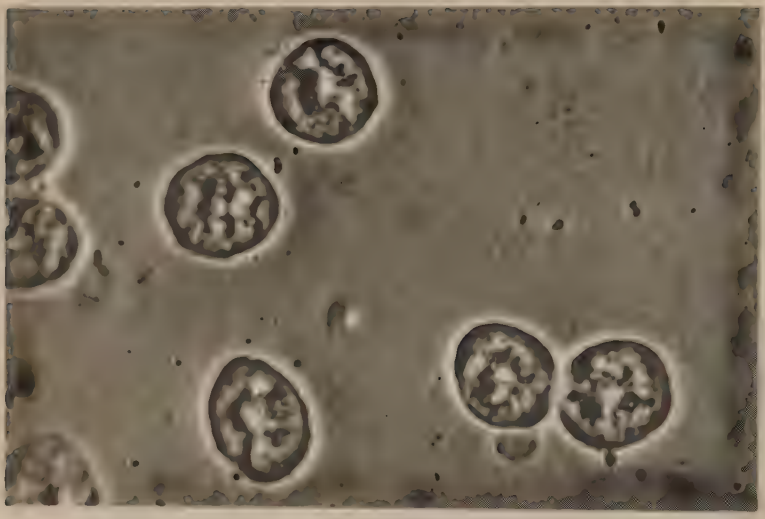

Abbildung 15 : Kaninchengranulozyten mit Newcastle disease Virus

(Zeit:"0"; Phasenkontrastmikroskop, 800fach)

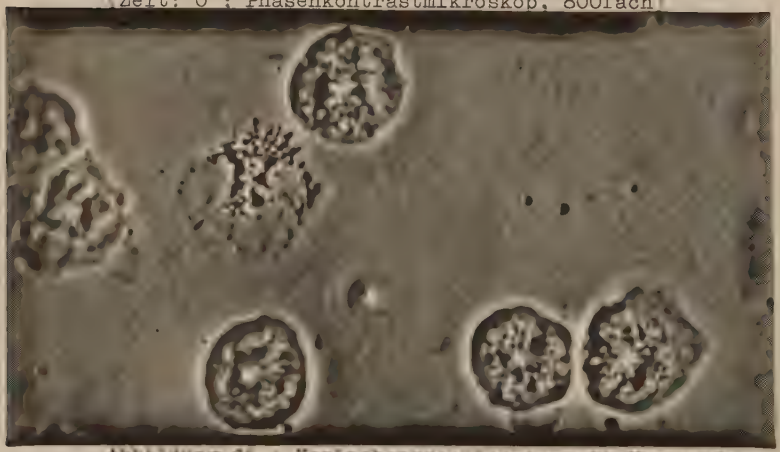

Abbildung 16 : Kaninchengranulozyten mit Newcastle disease Virus

(Zeit: 5 Minuten,37°; Phasenkontrastmikroskop,800fach)

war dagegen das Verhältnis von Virus zu Zelle bei 250 Viruspartikeln pro Granulozyt weniger als 1:400 (0,25%).

II. Beeinflussung der Zellatmung durch:

1) Influenzavirus A PR-8 und Newcastle disease Virus

Nachdem gezeigt worden war, daß Kaninchengranulozyten innerhalb weniger Minuten Newcastle disease Virus aufnehmen und in morphologisch erkennbarer Weise geschädigt werden, wurde geprüft, wie sich die Zellatmung unter Einwirkung von Myxoviren verändert.

Für Stoffwechselveränderungen stellt die Messung der Zellatmung einen empfindlichen Indikator dar. In Abbildung 17 ist die normale Atmungskurve für 1 x 10^8 Kaninchengranulozyten angegeben (-o-). Der Sauerstoffverbrauch betrug danach 4,0 $\pm$ 0,4 (μl O_2/Stunde und mg Zelltrockengewicht). Angegeben ist der mittlere Fehler nach Gauss. Wurden den Inkubationsansätzen nach 60 Minuten 2000 HE Newcastle disease Virus zugegeben, so verminderte sich die Atmung um etwa 25% auf 3,0 $\pm$ 0,3 (μl O_2/Stunde und mg Zelltrockengewicht) (Abbildung 17, -x-). Beide Kurven (-o- ; -x-) stellen Mittelwerte aus 19 Meßkurven dar.

Eine Änderung der Atmung konnte dagegen durch Zugabe der gleichen Konzentration von Influenzavirus - gegenüber dem Kontrollwert ohne Virus - nicht nachgewiesen werden.

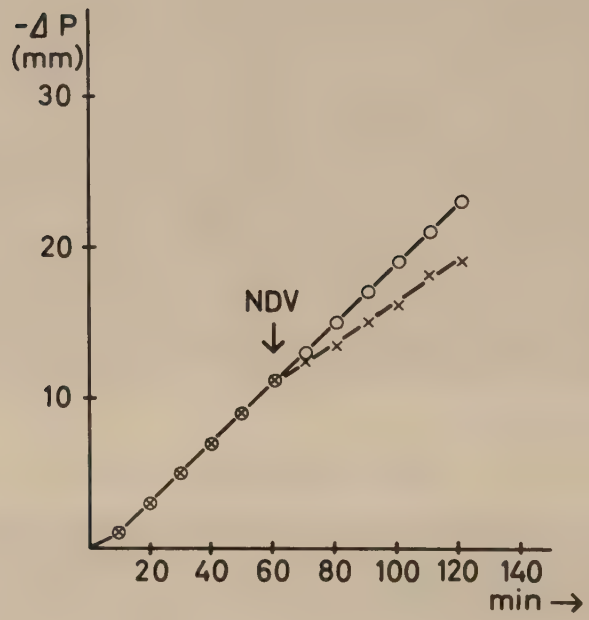

Abbildung 17 : Atmungskurve für 1 x 10^8 Kaninchen-granulozyten

-x- Meßkurve vor und nach der Viruszugabe (↓ = 2 000 HE Newcastle disease Virus)

-o- Kontrollkurve ohne Viruszugabe, gemessen in einem zweiten Warburggefäß

Aufgetragen ist die Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes in mm gegen die Versuchsdauer in Minuten (Mittelwert jeweils von 19 Messungen).

2) Vorbehandeltes Newcastle disease Virus

Die bisherigen Experimente wurden mit voll infektiösen, vermehrungsfähigen Virussuspensionen durchgeführt. Es war deshalb zu prüfen, ob die durch Newcastle disease Virus verursachte Änderung der Zellatmung auf die Infektiosität zu beziehen ist oder ob dafür das Haemagglutinin oder die Neuraminidase verantwortlich sind. Diese Virusqualitäten werden bei der beschriebenen Wärmebehandlung nacheinander zerstört (135).

Eine ursprünglich 3000 HE entsprechende, aber wärmeinaktivierte Virusmenge zeigte dagegen keinen Einfluß mehr auf den Sauerstoffverbrauch der Granulozyten. Ebenfalls ging die Wirkung auf die Zellatmung verloren, wenn die Viruspartikel durch Ätherbehandlung zerlegt wurden. Das Haemagglutinin war also ebenfalls nicht verantwortlich zu machen. Deshalb war die Frage berechtigt, ob die Viruswirkung an seine Infektiosität, das heißt an die Ribonucleinsäure, gebunden ist. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden etwa 30 000 HE Newcastle disease Virus der kombinierten Phenol-Natriumdodecylsulfat-Behandlung unterworfen. Hierbei bleibt allerdings die Virusnucleinsäure nicht intakt, sondern man erhält sie in Form hochmolekularer Bruchstücke, die nicht mehr infektiös sind. Dennoch erschien der Versuch, diese Nucleinsäurestücke auf die Zellen einwirken zu lassen, durchaus berechtigt, weil vielleicht für die Zellwirkung des Virus gar nicht die gesamte, intakte und infektiöse Nucleinsäure notwendig ist, sondern auch schon bestimmte hochmolekulare Teilstücke diesen Effekt codieren könnten. Die ge-

wonnene Virusribonucleinsäure zeigte unter den gewählten experimentellen Bedingungen jedoch keine Wirkung auf die Zellatmung.
Eine andere Möglichkeit zur Entscheidung der Frage, ob die Nucleinsäure für die Verminderung der Zellatmung verantwortlich ist, besteht in der Behandlung des Newcastle disease Virus mit Iminochinon (BAYER A 139). Das Präparat spaltet unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nur die Nucleinsäure, nicht aber Protein (120). In den Versuchen verhielt sich das vorbehandelte Virus dem unbehandelten gleichwertig. In beiden Fällen wurde die Zellatmung eindeutig - um durchschnittlich 20% - vermindert. Demnach dürften die Virusnucleinsäure und damit die Infektiosität nicht für die Atmungsverringerung der Leukozyten verantwortlich sein, zumal ja keine Vermehrung stattfindet.

3) Neuraminidase

Im Hinblick auf den möglichen Einfluß der Virusneuraminidase wurden zusätzliche Versuche mit je 200 Einheiten Neuraminidase aus Vibrio cholerae (BEHRINGWERKE, Marburg) durchgeführt. Das Enzym besitzt eine ähnliche Substratspezifität wie das Virusferment. Die Zugabe des reinen Präparates zum Warburggefäß ergab ebenfalls keine Beeinflussung der Zellatmung.
Die vorstehenden Untersuchungen haben also keinerlei Hinweise dafür ergeben, daß für die Beeinträchtigung des Sauerstoffverbrauchs die Infektiosität, das Haemagglutinin oder die Neuraminidase verantwortlich sind.

III. Beeinflussung der Zellglykolyse durch:

1) Influenza A PR-8 und Newcastle disease Virus

Um einen weiteren Einblick in die Stoffwechselveränderungen durch Myxoviren zu gewinnen, wurde außer der Zellatmung auch die Glykolyse untersucht. Methodisch erwies sich hierbei die direkte Titration der gebildeten Milchsäure am Autotitrator am geeignetsten. Wie enzymatische Parallelbestimmungen des Lactats ergaben, führt das ausgearbeitete Titrationsverfahren zu einwandfreien Ergebnissen.
Die Abbildung 18 zeigt, daß die Milchsäurebildung der Granulozyten durch Zugabe von ca 6000 HE Influenzavirus reproduzierbar um etwa 10% gehemmt wurde. Sein Einfluß auf den Stoffwechsel war wiederum wesentlich geringer als beim Newcastle disease Virus, das die Milchsäurebildung um 70% reduzierte (Abbildung 19) (im Durchschnitt von 11 Versuchen von 26 auf 7 µg/Stunde und mg Trockengewicht). Die Abbildung 20 stellt das Ergebnis eines Versuchs unter anaeroben Bedingungen dar. Obwohl die Lactatbildung stark vermindert war, ließ sich die virusbedingte Abnahme noch gut beobachten. Langzeitversuche (Abbildung 21) ergaben, daß die Granulozyten unter günstigen Bedingungen noch nach 4 Stunden auf Glucose- oder Viruszugabe in Form einer Glykolysesteigerung bzw. -verminderung reagieren.

2) Vorbehandeltes Newcastle disease Virus

Auch hinsichtlich der Zellglykolyse sollte geprüft werden, ob die virusinduzierten Änderungen mit der Infektiosität

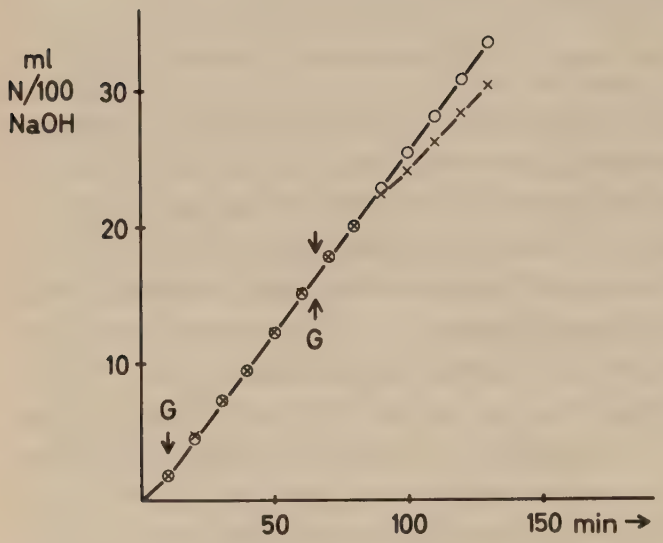

Abbildung 18 : Glykolysekurve für 5×10^8 Granulozyten

-x- Meßkurve vor und nach Viruszugabe (↓ = 6 000 HE Influenzavirus A PR-8)

-o- Kontrollkurve ohne Viruszugabe

Aufgetragen ist der Verbrauch an N/100 NaOH in ml gegen die Versuchsdauer in Minuten.

Bei "G" jeweils Zugabe von 20 mg D-Glucose.

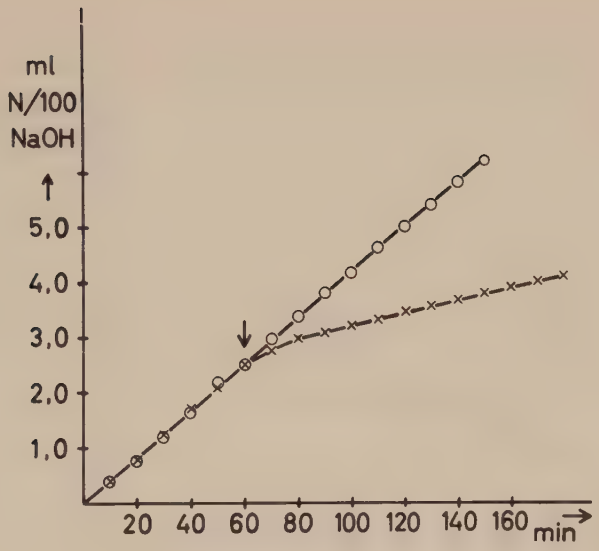

Abbildung 19 : Glykolysekurve für 5 x 10^8 Granulozyten

-x- Meßkurve vor und nach Viruszugabe (↓ = 6 000 HE Newcastle disease Virus). Nach 0; 30; 60; 120 und 180 Minuten wurden jeweils 3 ml für die Enzymbestimmungen entnommen.

-o- Kontrollkurve vor und nach der Zugabe (↓) von ursprünglich 6 000 HE hitzeinaktiviertem Virus. Zeitwerte wie bei der Meßkurve.

Aufgetragen ist der Verbrauch an N/100 NaOH in ml gegen die Versuchsdauer in Minuten.

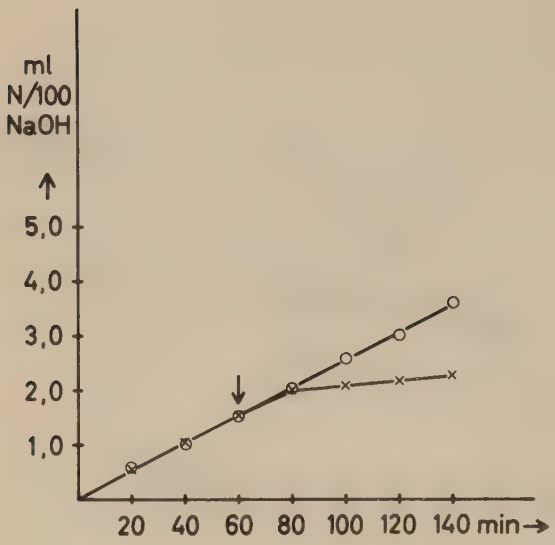

Abbildung 20 : Glykolysekurve für 5 x 10^8 Granulozyten

-x- Meßkurve vor und nach Viruszugabe (↓ = 6 000 HE Newcastle disease Virus). Die Messung erfolgte anaerob unter Argon.

-o- Kontrollkurve ohne Viruszugabe (anaerob).

Aufgetragen wurde der Verbrauch an N/100 NaOH in ml gegen die Versuchsdauer in Minuten.

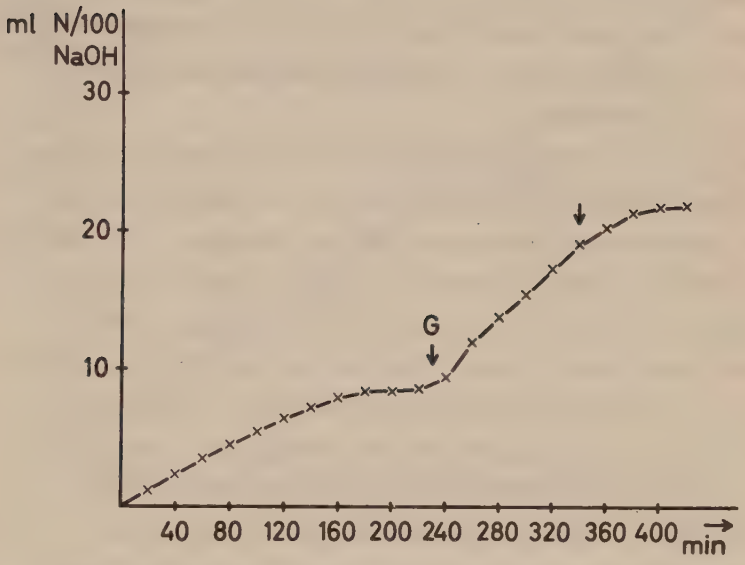

Abbildung 21 : Glykolysekurve für 5 x 10^8 Granulozyten
Bei "G" Zugabe von 20 mg D-Glucose (nach 240 Minuten).
Bei ↓ Zugabe von 6 000 HE Newcastle disease Virus.
Aufgetragen ist der Verbrauch an N/100 NaOH in ml gegen die Versuchsdauer in Minuten.

zusammenhängen. Es wurde daher auch nicht mehr vermehrungs=fähiges, auf verschiedene Weise inaktiviertes Virus herange=zogen. Diese Frage wurde ebenfalls am Modell Newcastle dis-ease Virus wegen seiner ausgeprägten Wirkung auf die Zell=glykolyse untersucht.

Analog zu den Atmungsmessungen übte dieses Virus nach Wärme=inaktivierung bzw. Ätherbehandlung keinen Einfluß mehr auf die Granulozytenglycolyse aus. In der Abbildung 22 ist als Beispiel ein Versuch dargestellt, in dem zunächst 6000 HE wärmeinaktiviertes Virus, danach die gleiche Menge voll=infektiöses Virus zu einer Granulozytensuspension zugegeben wurden. Im Gegensatz zum inaktivierten zeigte das vermeh=rungsfähige Virus auch bei der nachträglichen Zugabe noch einen deutlichen Effekt auf die Zellglykolyse. Die phenol=extrahierte Virusnucleinsäure erwies sich auch bei der Glykolysemessung als unwirksam. Das mit Iminochinon (BAYER A 139) behandelte Virus vermag dagegen die Bildung von Milchsäure in den Kaninchengranulozyten stark zu hemmen. Die Verminderung der Zellglykolyse ist daher - ebenso wie bei der Atmung - nicht auf das Haemagglutinin, die Neurami=nidase oder Infektiosität des Virus zurückzuführen.

3) Neuraminidase

Analog zu den Atmungsmessungen wurden je 200 Einheiten Neuraminidase aus Vibrio cholerae (BEHRINGWERKE, Marburg) auf ihre Glykolysehemmwirkung untersucht. In keinem Fall konnte eine Verringerung der Milchsäurebildung in den Gra=nulozyten beobachtet werden.

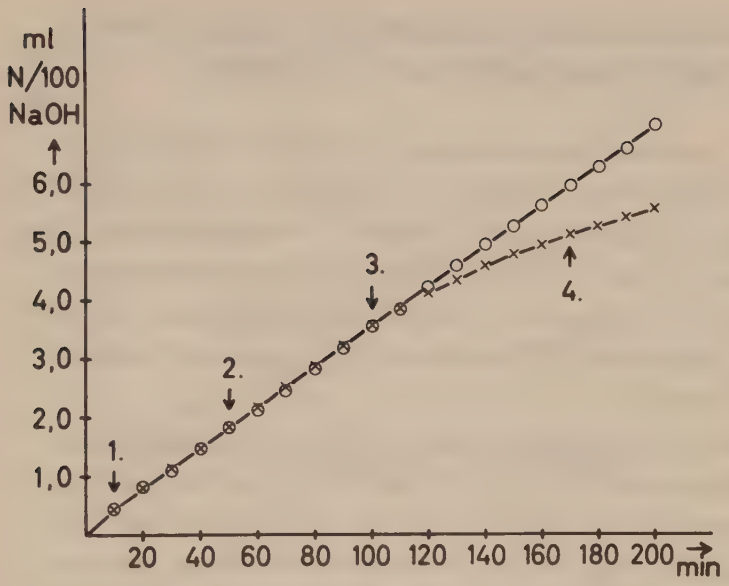

Abbildung 22 : Glykolysekurve für 5 x 10^8 Granulozyten VOR und NACH Zugabe von hitzeinaktiviertem sowie aktivem Newcastle disease Virus

1. Zugabe von 20 mg D-Glucose.
2. Zugabe von 6 000 HE hitzeinaktiviertem Newcastle disease Virus.
3. Zugabe von 6 000 HE aktivem Newcastle disease Virus.
4. Zur Kontrolle nochmals Zugabe von 20 mg D-Glucose.

-x- Meßkurve vor und nach Zugabe von aktivem Newcastle disease Virus, D-Glucose und inaktiviertem Virus.

-o- Kontrolle ohne Newcastle disease Virus.

IV. Einfluß des Newcastle disease Virus auf die Enzym= ausschüttung der Granulozyten und Granula

Die bisherigen Versuche ergaben, daß trotz Fehlens einer Virusvermehrung die Atmung und besonders die Glykolyse der Kaninchengranulozyten durch Newcastle disease Virus deutlich gehemmt werden. Die virusbedingten Stoffwechseländerungen wiesen auf erhebliche intrazelluläre Veränderungen hin, die sich möglicherweise auch auf die Zellgranula und Zellwand erstrecken.
Es sollte daher geprüft werden, ob bei der Viruseinwirkung gleichlaufend mit den Stoffwechseländerungen bestimmte cha= rakteristische Enzyme von den Zellen in das Außenmedium abgegeben werden. Obwohl die Versuche mit beiden Myxoviren durchgeführt wurden, werden hier nur die Ergebnisse mit dem Newcastle disease Virus wiedergegeben, weil es auch bei diesen Untersuchungen wesentlich stärkere Wirkungen zeigte.

1) Lipase/Esterase

Zunächst wurde ein Normalansatz Kaninchengranulozyten (5 x 10^8 Zellen in 70 ml) unter den beschriebenen Versuchsbedin= gungen 5 Minuten mit Ultraschall behandelt (MOLLARD Equip- ment, 7680, 55 Watt). Die Messungen der Enzymaktivität des klaren Überstandes ergaben nach der Zentrifugation (8000*g*) einen Wert von 28 Einheiten/ml (Definition und Messung s. Teil B). Wie die Abbildung 23 zeigt, wurden innerhalb der ersten Stunden keine Lipasen/Esterasen von den Zellen ab= gegeben. Bei Inkubationsansätzen über 3 Stunden traten da=

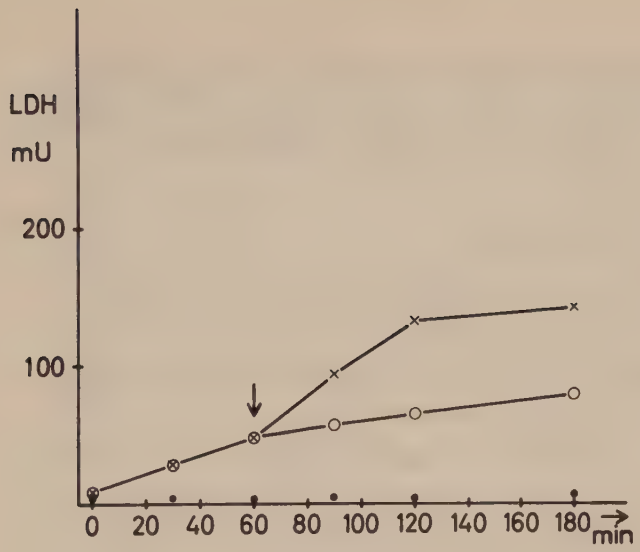

Abbildung 23 : Messung der Lipase/Esterase-Aktivität

_ . _ Meßpunkte. Der Übersichtlichkeit wegen wurde, da die Werte praktisch Null betragen, keine Ordinate für Lipase/Esterase-Einheiten eingezeichnet.

Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität

-x- Meßkurve vor und nach der Zugabe von 6 000 HE newcastle disease Virus (↓).

-o- Kontrollkurve vor und nach Zugabe von hitzeinaktiviertem Virus (Ausgangsmenge 6 000 HE Newcastle disease Virus). Aufgetragen ist die Enzymaktivität in mU/ml gegen die Versuchsdauer in Minuten.

gegen im Überstand zunehmende Mengen an Lipasen/Esterasen auf. Die Messungen gehören zu Zeitwerten, die dem in der Abbildung 19 dargestellten Versuch entnommen wurden.

2) Lactatdehydrogenase

Auch für die Lactatdehydrogenase wurde zunächst ein den Versuchsbedingungen entsprechender "100%-Wert" ermittelt. Die Ultraschallbehandlung ergab im Überstand eine Enzymaktivität von 537 mU/ml. In der Abbildung 23 erfolgten die Messungen eines Normal-Inkubationsansatzes (Versuch Abbildung 18) vor und nach der Viruszugabe. Die Lactatdehydrogenase-Ausschüttung wurde hiernach durch die Viruszugabe innerhalb 1 Stunde eindeutig von 66 mU/ml auf 134 mU/ml erhöht. Die Endwerte betrugen nach insgesamt 3 Stunden Inkubation 80 mU/ml ohne Virus und 144 mU:ml mit Virus.

3) Alkalische Phosphatase

Die Messung der normalen Enzymaktivität im Ultraschallversuch ergab einen Wert von 26 mU/ml (= 100%).
In der Abbildung 24 sind die Daten der obigen Zeitwerte für die alkalische Phosphatase dargestellt.
30 Minuten nach der Viruszugabe betrug der Enzymwert bereits 14 mU/ml gegenüber 5,2 mU/ml ohne Virus. Durch die Virus-einwirkung wurden demnach in kurzer Zeit 54% der durch Ultraschall freisetzbaren Enzymaktivität (= 100%) ausgeschüttet.

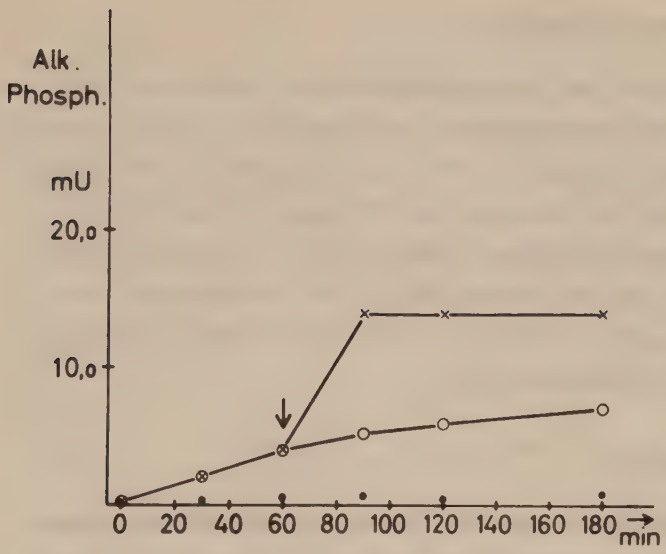

Abbildung 24 : Messung der alkalischen Phosphatase

-x- Meßkurve vor und nach Viruszugabe (↓ = 6 000 HE Newcastle disease Virus).

-o- Kontrollkurve vor und nach Zugabe von hitzeinaktiviertem Virus.

Aufgetragen ist die Aktivität in mU/ml gegen die Versuchsdauer in Minuten.

Messung der sauren Phosphatase

-.- Meßpunkte (ebenfalls in mU/ml) .

4) Saure Phosphatase

Die Bestimmung der sauren Phosphatase im ultraschallbehandelten Granulozytenüberstand ergab den Wert 0 mU/ml. Dieser Befund stimmt mit den Literaturangaben (66,77) überein, wonach die Leukozyten nur über ganz geringe Mengen an einer sauren Phosphatase (Sammelbegriff für mehrere Enzyme) verfügen. Auch die in der Abbildung 24 eingetragenen Meßpunkte zeigen, daß unter dem Viruseinfluß keine saure Phosphatase freigesetzt wurde.

5) Lysozym

Die im Granulozytenüberstand nach der Ultraschallbehandlung gefundene Lysozymmenge ergab an Hand der ermittelten Eichkurve einen "100%-Wert" von 12 µg/ml (Probe 1:10 verdünnt). Wie aus den Abbildungen 25 und 26 hervorgeht, stieg die ausgeschüttete Lysozymmenge nach der Viruszugabe von 1,20 auf 3,25 µg/ml, der Wert für die Kontrolle ohne Virus von 1,20 auf 2,00 µg/ml.

6) Peroxydase

Im Überstand der ultraschallbehandelten Granulozyten konnte überraschenderweise keine Peroxydaseaktivität nachgewiesen werden. Da die Leukozyten nach übereinstimmenden Literaturangaben (2,3,115) reich an Peroxydase sind, muß ihr Fehlen im Überstand auf den Reaktionsbedingungen ihrer Freisetzung beruhen. Das Enzym ist offensichtlich fest an bestimmte Zellelemente gebunden. Ein Kontrollversuch mit kristalli-

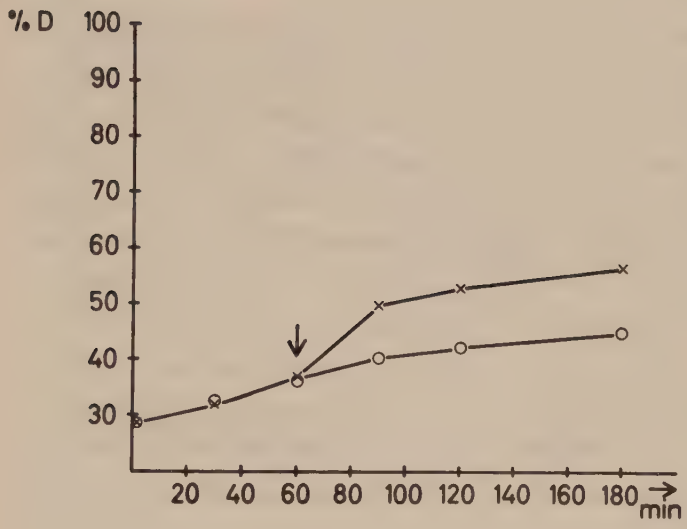

Abbildung 25 : Messung der Lysozym-Aktivität

-x- Meßkurve vor und nach Viruszugabe (↓ = 6 000 HE Newcastle disease Virus).

-o- Kontrollkurve vor und nach der Zugabe von hitzeinaktiviertem Virus (ebenfalls ursprünglich 6 000 HE).

Aufgetragen ist die Lysozymaktivität in %Lichtdurchlässigkeit bei 540 mμ (Micrococus-Lysodeicticus-Suspension) gegen die Versuchsdauer in Minuten.

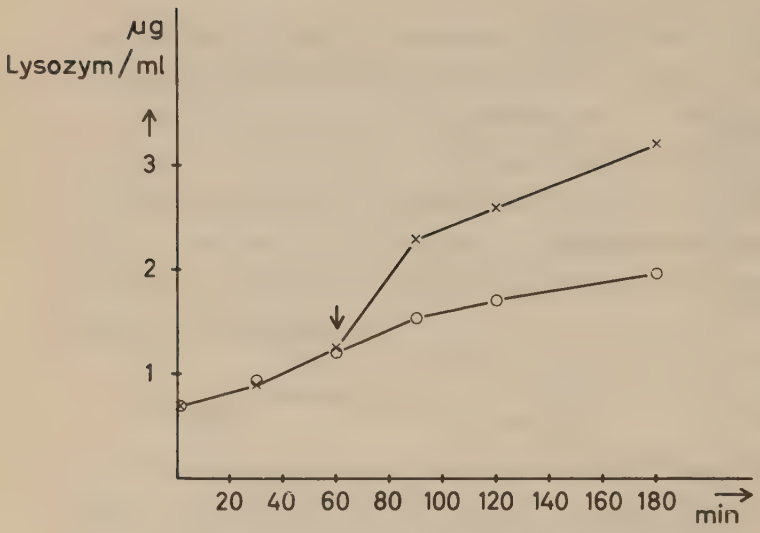

Abbildung 26 : Bestimmung der Lysozymmenge aus der Aktivität an Hand der Eichkurve (Versuch Abbildung 25)

-x- Meßkurve vor und nach Viruszugabe.

-o- Kontrollkurve vor und nach Zugabe von hitzeinaktiviertem Virus (↓ = 6 000 HE Newcastle disease Virus). Aufgetragen wurde die Lysozymmenge in µg/ml gegen die Versuchsdauer in Minuten.

sierter Peroxydase (SERVA, Heidelberg) verlief positiv. Auch die Messung der Zeitwerte ergab keine Peroxydaseaktivität.

Bei intakten Zellen erfolgte unter dem Einfluß von Newcastle disease Virus eine erhöhte Ausschüttung von Lactatdehydrogenase, alkalischer Phosphatase sowie Lysozym. Da es sich hierbei um Enzyme handelt, die zu einem erheblichen Teil in den Granula (Lysosomen) lokalisiert sind, lag der Gedanke nahe, die Experimente zur virusinduzierten Enzymausschüttung mit isolierten Granula zu wiederholen. Hiervon waren Hinweise zu erwarten, inwieweit das Virus in der Lage ist, die Granula bzw. die Granulamembran zu verändern.

Bei der Inkubation der - aus jeweils 2 x 10^9 Granulozyten gewonnenen - Granula mit und ohne Virus konnte im Gegensatz zu den Versuchen mit intakten Granulozyten eine Lipase/Esterase-Aktivität im Überstand innerhalb von 3 Stunden nachgewiesen werden. Die Messungen mit Virus lagen dabei mit durchschnittlich 24 Einheiten/ml gegenüber denen ohne Virus - durchschnittlich 20 Einheiten/ml, gemessen 30 Minuten nach Viruszugabe - geringfügig höher (Definition und Messung s. Teil B). Versuche, die Viruswirkung durch spezifisches Kaninchen-Anti-Serum zu neutralisieren, ließen sich nicht durchführen, weil das Antiserum bereits über eine erhebliche Lipase/Esterase-Aktivität verfügte.

Analog zu den Granulozytenversuchen stieg auch bei der Inkubation von Granula mit Newcastle disease Virus die Lactatdehydrogenase-Aktivität erheblich an (siehe Abbildung 27). 10 Minuten nach der Viruszugabe war der LDH-Wert von etwa 70 auf 250 mU/ml angestiegen, der Vergleichswert mit inakti-

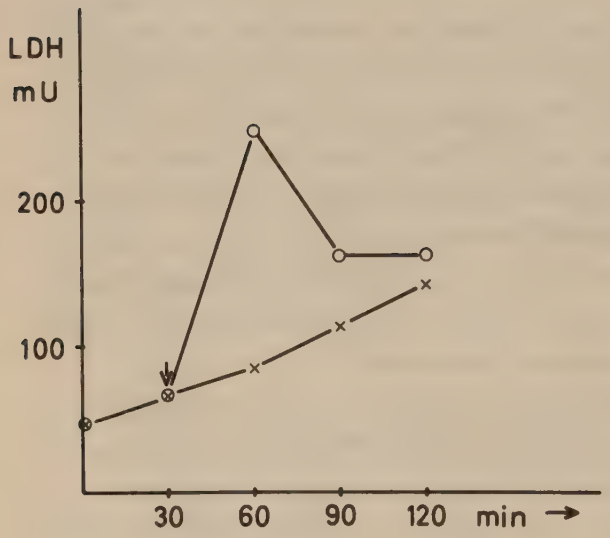

Abbildung 27 : Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität von isolierten Leukozyten-Granula
(Ausgangsmenge 2 x 10^9 Granulozyten)

-o- Meßkurve vor und nach Viruszugabe (↓ = 3 000 HE Newcastle disease Virus).

-x- Kontrollkurve vor und nach Zugabe von hitzeinaktiviertem Virus.

viertem Virus dagegen nur von 70 auf 85 mU/ml. Der anschließende Aktivitätsabfall bei Viruseinwirkung scheint eine Eigenart der Granula zu sein und dürfte auf der Ausschüttung proteolytischer Enzyme beruhen. So konnte im Trypsintest (nach BOEHRINGER, Mannheim) eine starke Zunahme tryptischer Fermente im Überstand nach der Viruszugabe beobachtet werden.
In Abbildung 28 ist der gleiche Versuch, jedoch zusätzlich mit Anti-Serum gegen Newcastle disease Virus (4000 HE Hemmung) dargestellt. In Gegenwart von Immunserum stieg der Lactatdehydrogenase-Wert nur von 62 auf 96 mU/ml. Die durch das Virus induzierte Lactatdehydrogenase-Ausschüttung wird demnach durch das entsprechende Antiserum deutlich gehemmt.

Bei Inkubation der Granula konnte zwar im Überstand eine Aktivität an alkalischer Phosphatase gemessen werden, aber die Werte mit Virus lagen - im Gegensatz zu den Granulozyten-Versuchen -nicht eindeutig über dem Vergleichswert.
Im Verlauf der Granulainkubation konnte, ähnlich wie bei den intakten Granulozyten, jeweils nur eine geringe Aktivität gemessen werden.
Analog zu den Lactatdehydrogenase-Befunden nahm bei den isolierten Granula auch die Lysozym-Aktivität nach der Viruszugabe im Überstand zu. 30 Minuten später war der Lysozym-Wert von 36 auf 41,4 % Lichtdurchlässigkeit angestiegen, der Vergleichswert dagegen von 36 auf 32,5 % verändert (Abbildung 29). Verglichen mit dem Vergleichsansatz ergibt sich daraus ein virusinduzierter Gesamtanstieg von 8,9 %.

In der Abbildung 30 ist der gleiche Versuch, jedoch unter Zugabe von Anti-Serum gegen Newcastle disease Virus 4000 HE Hemmung), dargestellt. Auch hier blieb der Anstieg

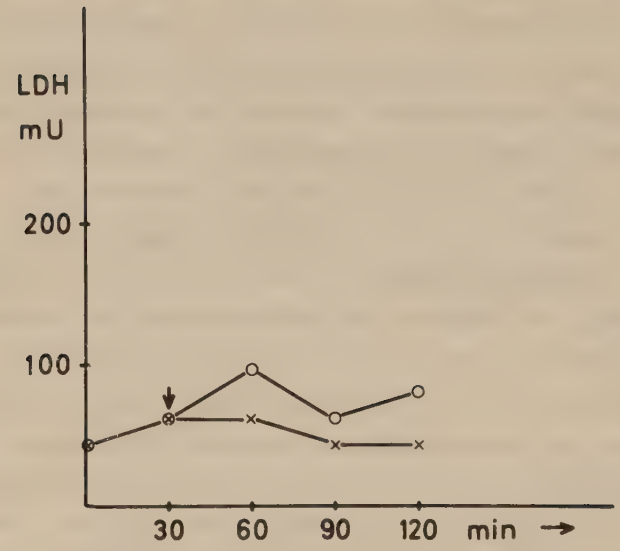

Abbildung 28 : Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität von isolierten Granula aus Leukozyten (Ausgangsmenge 2 x 10^9 Granulozyten)

-o- Meßkurve vor und nach Zugabe von 3 000 HE (↓) Newcastle disease Virus + Antiserum.

-x- Kontrollkurve vor und nach Zugabe von hitzeinaktiviertem Newcastle disease Virus.

Aufgetragen ist die Enzymaktivität in mU/ml gegen die Versuchsdauer in Minuten bei 37° .

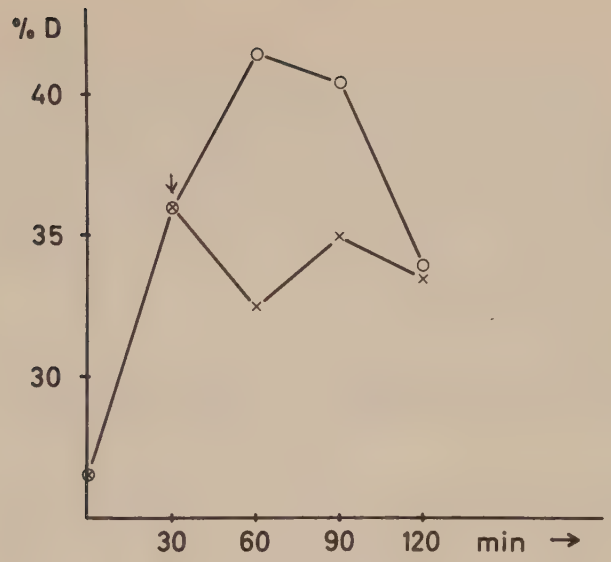

Abbildung 29 : Messung der Lysozym-Aktivität von isolierten Leukozyten-Granula

(Ausgangsmenge 2 x 10^9 Granulozyten)

-o- Meßkurve vor und nach Viruszugabe (↓ = 3 000 HE Newcastle disease Virus).

-x- Kontrollkurve vor und nach Zugabe von hitzeinaktiviertem Newcastle disease Virus.

Aufgetragen ist die Enzymaktivität in %Lichtdurchlässigkeit bei 540 mu (Micrococcus-Lysodeicticus-Suspension) gegen die Versuchsdauer in Minuten.

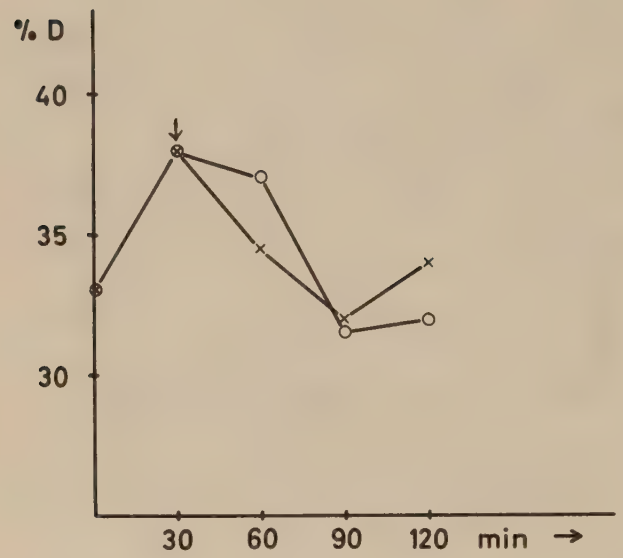

Abbildung 30 : Messung der Lysozym-Aktivität von isolierten Leukozyten-Granula

(Ausgangsmenge 2 x 10^9 Granulozyten)

-o- Meßkurve vor und nach Zugabe von 3 000 HE Newcastle disease Virus + Antiserum (↓).

-x- Kontrollkurve vor und nach Zugabe von hitzeinaktiviertem Newcastle disease Virus.

der Lysozym-Aktivität - wie bei der Granulozytenzelle - aus, was auf die Spezifität der Viruswirkung hinweist.
In den Inkubationsüberständen konnte jeweils nur eine geringe Peroxydase-Aktivität nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne Virus wurde nicht beobachtet.

V. Isolierung und physiko-chemische Charakterisierung des endogenen Pyrogens

Nachdem der Einfluß des Newcastle disease Virus auf den Zellstoffwechsel und die Enzymausschüttung bekannt war, wurden die beiden Wirkstoffe endogenes Pyrogen und Interferon untersucht.
Myxoviren rufen beim Kaninchen nach intravenöser Injektion Fieber hervor (136). Die Viruspyrogene wirken aber nicht direkt auf das Temperaturregulationssystem im Zwischenhirn ein, sondern indirekt durch Induktion eines endogenen, von Körperzellen stammenden Fieberstoffes. Er entsteht ebenfalls in vitro bei Inkubation von Leukozyten mit Myxoviren (15, 131). Bei längerer Alterung der Leukozyten tritt auch ohne Anwesenheit von Virus ein Leukozytenpyrogen auf (26,80). Deshalb wurde geprüft, ob das sekundäre Pyrogen nach Inkubation von Kaninchengranulozyten mit Newcastle disease Virus bzw. Influenzavirus A PR-8 im Überstand beschleunigt oder verstärkt erscheint.
Bereits die ersten Versuche zeigten, daß der in der Ultrazentrifuge unter sterilen und apyrogenen Bedingungen gewon-

nene Überstand des Leukozyten-Virusgemisches im Kaninchentest Fieber erzeugt. Der von Virushaemagglutinin und Zellen weitgehend befreite Überstand enthält das endogene Pyrogen, das man daran erkennt, daß es im Gegensatz zu exogenen Pyrogenen ohne Latenzphase zur Fieberreaktion führt und als Protein hitzelabil ist. Damit läßt es sich von bakteriellen Endotoxinen leicht unterscheiden.

Zeitversuche mit und ohne Virus ergaben bei gleicher Leukozytenzahl, daß der Fieberindex des Inkubationsüberstandes "Mit Virus, 3 Stunden, 37°" dem des Überstandes "Ohne Virus, 20 Stunden, 37°" entspricht. Demnach wird in erster Linie die Geschwindigkeit der endogenen Pyrogenausschüttung und nicht so sehr die Menge beeinflußt. Wurden die beiden Ansätze (mit und ohne Virus) zur gleichen Zeit nach 3 Stunden bei 37° verglichen, so ergab sich für die Inkubation mit Virus ein etwa 8-10facher Fieberindex.

Es sollte zunächst geprüft werden, in welchen Strukturen der Zelle das endogene Pyrogen lokalisiert ist. Wurden Kaninchengranulozyten durch Osmoseschock (destilliertes Wasser) oder Ultraschall lysiert und die Zellwände mehrmals gewaschen, so zeigte dieses Material, dessen Konzentration den Versuchen mit intakten Zellen entsprach, im Kaninchentest kein Fieber. Auch eine Inkubation von 1 Stunde bei 40° bzw. 2 Stunden bei 37° mit und ohne Newcastle disease Virus bewirkte im anschließenden Ultrazentrifugationsüberstand keine Pyrogenität.

Die nach COHN und HIRSCH (34,35) isolierte Granulafraktion von 1 x 10^9 Granulozyten führte weder in 0,34 M Sucrose noch in 0,15 M Kochsalz zu Fieber im Kaninchentest.

Wurden die Granula dagegen bei 40° inkubiert, so ergab der klare Überstand jedoch eine eindeutige Fieberreaktion. Eine Inkubation mit Newcastle disease Virus bewirkte darüber hinaus eine weitere, wenn auch nur geringe Pyrogenitäts= steigerung des Überstandes. Demnach dürfte ein großer Teil der Pyrogenität mit den Granula in Beziehung stehen oder dort lokalisiert sein. Hinweise hierfür lieferten bereits Arbeiten von ZWEIFACH und JANOFF (1959), WEISMANN (157) so= wie besonders von HERION et al. (68). Die Feststellung der letzteren Autoren, daß die Granula (Lysosomen) bereits ohne Inkubation im Kaninchen Fieber erzeugen, steht im Wider= spruch zu den vorliegenden Befunden. Wahrscheinlich ist die Fieberwirkung der Gesamtlysosomen davon abhängig, inwieweit die Partikel durch die vorausgehende Isolierung bereits ge= schädigt sind. Die Tatsache, daß eine längere Inkubation mit Newcastle disease Virus zur Erzeugung des endogenen Pyrogens notwendig ist, weist darauf hin, daß es entweder in einer Vorstufe oder aber in einer festgebundenen Form vorliegt.

Nachdem Anhaltspunkte über die Herkunft des Fieberstof= fes vorlagen, ergab sich die Aufgabe, das während der Virus= einwirkung von Zellen abgegebene endogene Pyrogen physika= lisch und chemisch näher zu charakterisieren:

Säulenchromatographie

Zunächst wurde eine Reinigung über Biogel-Säuren versucht. In den Abbildungen 31, 32 und 33 sind als Beispiele drei säulenchromatographische Trennungen dargestellt. Auf der P-30-Säule erfolgte noch keine Auftrennung. Die gesamte Pyro= genität (und Lipaseaktivität/2ml Probelösung) befand sich

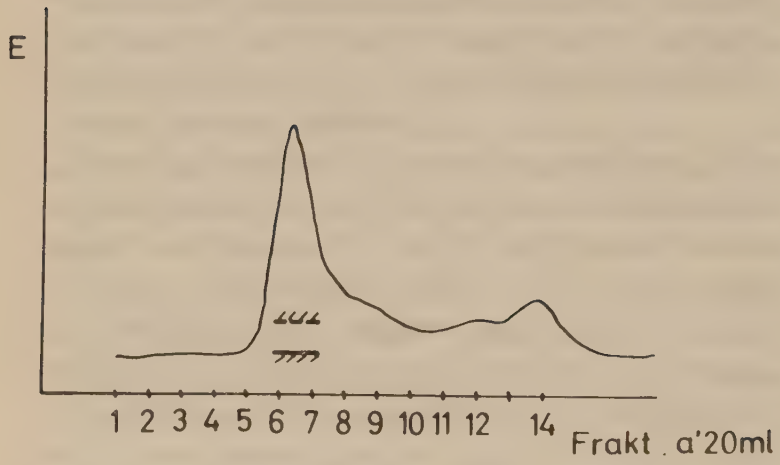

Abbildung 31 : Säulenchromatographische Auftrennung von endogenem Pyrogen auf einer P-30 Säule

Aufgetragen ist die Extinktion des Eluates bei 254 mμ gegen die Zahl der Fraktionen.

Die untere Schraffur gibt die Lage der Pyrogenaktivität, die obere die Zone einer Lipase/Esterase-Aktivität an.

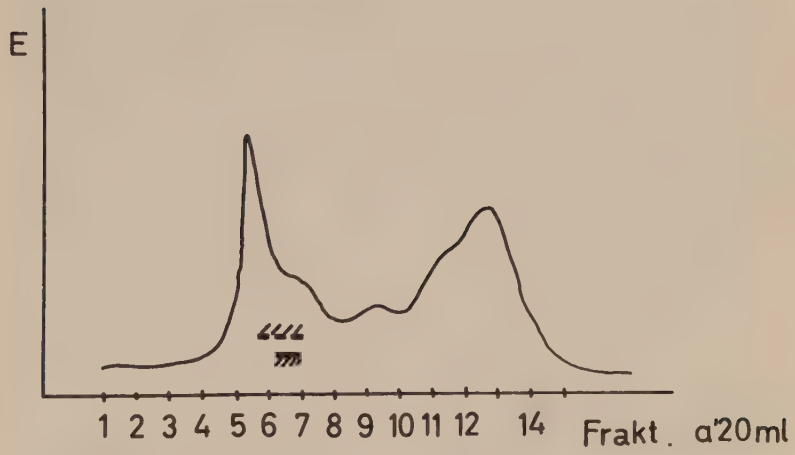

Abbildung 32 : Säulenchromatographische Auftrennung von endogenem Pyrogen auf einer P-60 Säule

Aufgetragen ist die Extinktion des Eluates bei 254 mμ gegen die Zahl der Fraktionen.

Die untere Schraffur gibt die Lage der Pyrogenaktivität, die obere die Zone einer Lipase/Esterase-Aktivität an.

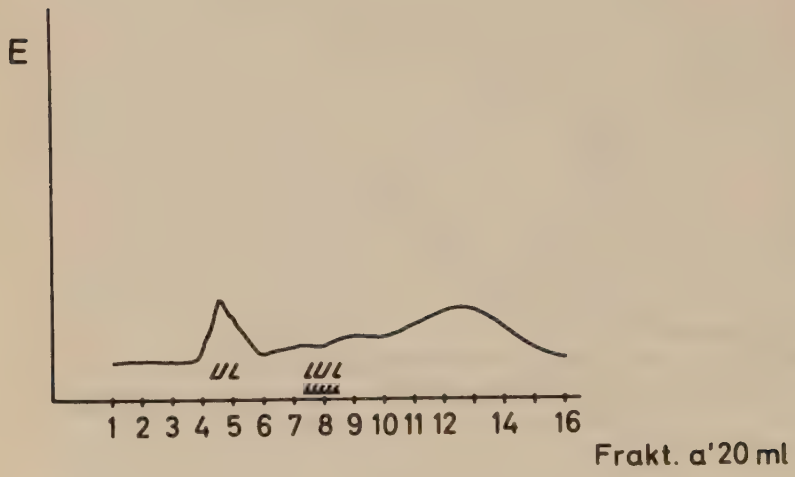

Abbildung 33 : Säulenchromatographische Auftrennung von endogenem Pyrogen auf einer P-100 Säule

Aufgetragen ist die Extinktion bei 254 mμ gegen die Zahl der Fraktionen.

Die untere Schraffur gibt die Lage der Pyrogenaktivität, die obere die Zone der Lipase/Esterase-Aktivität an.

(Tabelle 1) im Ausschlußgipfel. Erst bei der P-60-Säule trennte sich die Pyrogenaktivität von den Fraktionen des Ausschlußgipfels. Der Fieberindex FI_{2h} betrug für die Fraktion 6/7 13,5 cm^2. Bei der säulenchromatographischen Auftrennung auf einer P-100-Säule befand sich die Hauptmenge des endogenen Pyrogens in der Fraktion 8. Säulenläufe mit den Eichsubstanzen ergaben die Position Kaninchen-Hämoglobin (Fraktion-6), Pepsin (Fraktion-8) und Ribonuclease (Fraktion-9). Die Fraktion 8 dürfte somit einem Molekulargewichtsbereich von 30 000 - 40 000 entsprechen.

Stärkegelelektrophorese

Erste Versuche mit Kaninchen-Normalserum ergaben, daß die ausgearbeitete Elektrophorese auf Stärkegelsäulen zu guten Trennungen und zu sterilen und apyrogenen Fraktionen führt.

Ultrafiltration

Die Versuche mit dem Ultrafiltrationsgerät der MEMBRANFILTERGESELLSCHAFT, Göttingen, ergaben, daß das virusinduzierte Granulozytenpyrogen ein Molekulargewicht größer als 10 000 und kleiner als 70 000 besitzt. Der Ultrafiltrationsversuch mit dem LKB-Gerät zeigte, daß ein kleiner Teil (etwa 10%) der Pyrogenaktivität durch die Membran tritt, der größte Teil aber zurückgehalten wird. Auch dieser Befund würde für ein Molekulargewicht im Bereich von 30 000 bis 40 000 sprechen.

P 60

Fr.Nr.	E_{280}	Lip.E_{540}	Fieb.°C	INDEX cm^2
2	0,02	0	0	0
3	0,03	0	0,2	3,8
4	0,02	0,05	0,4	3,5
5	0,09	0	0,8	5,7
6	0,07	0,32	0,9	7,8
7	0,06	0	0,3	1,6
8	0,04	0	0,1	~0
9	0,05	0	0	0
10	0,08	0	0	0
11	0,10	0	0	0

Tabelle 1 : Messungen der Extinktionen bei 280 mμ, der Lipase/Esterase-Aktivität (E_{540} x 1,6 = Einheiten) sowie des Fieberindexes FI_{2h}.

Die Fraktionsnummern beziehen sich auf die säulenchromatographische Trennung in der Abbildung 32 (P-60 Säule).

Dampfdruck- und Membranosmometer

Die Untersuchungen im Dampfdruckosmometer ergaben, daß das Molekulargewicht des endogenen Pyrogens größer als 20 000 sein muß. Es konnten zwischen dem Lösungsmittel und der Probelösung keine signifikanten Temperaturunterschiede mehr festgestellt werden.

Im Membranosmometer ergab sich bei der 80%-Äthanol-Fraktion ein Wert von 0,25 cm. Hieraus errechnet sich ein durchschnittliches Molekulargewicht von

$$M_N = \frac{R \times T}{\pi/c} = 35.400$$

c = 0,35 g/l; R = 84,7; T = 298° K

In einem zweiten Versuch wurde statt in physiologischer Kochsalzlösung in 10%iger Ameisensäure/NaCl-Lösung gemessen. Hierbei ergaben sich folgende Werte:

π = 0,18 cm bei c = 0,24 g/l;

R = 84,7; T = 298°K

M_N = 33.700

Fällungsversuche

Fällungsversuche des Zentrifugenüberstands vom Inkubationsgemisch Virus-Leukozyten (mit Ammoniumsulfat oder Perchlorsäure) ergaben, daß etwa 50-70% der Pyrogenaktivität ausgefällt werden können.

Bei der fraktionierten Äthanolfällung wurden für einen Äthanolgehalt von 0; 17; 45; 62; 74 (%) folgende Fieberindices FH_{1h}, bezogen auf das gleiche Volumen, gefunden: 15,2; 0; 6,6; 7,6; 13,2 (cm^2).

Das endogene Pyrogen wird demnach erst bei hoher Äthanol-

konzentration ausgefällt, die Hauptmenge bei 74-80% Alkoholgehalt. Ein nennenswerter Verlust an Pyrogenaktivität war bei der Äthanolfällung, im Gegensatz zu den Salz/Säure-Fällungen, nicht zu beobachten.
Dem Fällungsverhalten nach konnte das endogene Pyrogen eventuell als Protein oder Proteid angesehen werden. Es wurden daher Wärmeinaktivierungsversuche durchgeführt.

Wärmebehandlung

Nach 30 Minuten bei 95° war in den meisten Fällen die Pyrogenität des Überstandes völlig verschwunden. In wenigen Beispielen erwies sich aber die Behandlung als völlig wirkungslos. Es stellte sich heraus, daß diese Proben durch geringe Mengen bakterieller Endotoxine (Lipopolysaccharide) verunreinigt waren. Sämtliche Präparationen von endogenem Pyrogen wurden daher diesem Hitzeinaktivierungstest unterworfen, um Verunreinigungen mit bakteriellen Pyrogenen erkennen zu können.
Da es sich bei dem endogenen Pyrogen nach dem Fällungsverhalten, der Wärmeinaktivierung sowie der Pepsin- und Trypsinspaltung (s.unten) um ein Protein oder Proteid handeln muß, wurde mit Chloromercuribenzoat untersucht, inwieweit freieSH-Gruppen für die pyrogene Wirkung mitverantwortlich sind.

Chloromercuribenzoat

Nach der Einwirkung des Chloromercuribenzoates zeigten die Proben einen mittleren Fieberwert von 0,4°; FU_{2h} = 3,5

(Kontrolle ohne Chloromercuribenzoat 1,1°; FI_{2h} = 12 cm^2) bei je drei Versuchstieren. Da der Index von 3,5 nicht mehr signifikant für eine echte Temperaturerhöhung ist, wurde demnach die Pyrogenität weitgehend zerstört.
Anschließend sollte untersucht werden, ob die Spaltung der zugänglichen S-S-Brücken ebenfalls zu einer Beseitigung der Pyrogenität führt. Die Spaltung erfolgte hierbei mit 2-Mercaptoäthanol.

2-Mercaptoäthanol

Die 2-Mercaptoäthanolkontrolle zeigte allein im Kaninchentest kein Fieber. Das zu untersuchende Pyrogenkonzentrat (1:5) ergab bei 2 x 2 ml (Bedingungen wie beim Chloromercuribenzoat) einen Mittelwert von 1,4°, entsprechend FI_{2h} = 14 cm^2. Nach der Einwirkung von 2-Mercaptoäthanol zeigten zwei Parallelansätze den Mittelwert 1,1°; FI_{2h} = 11,5 cm^2. Der größte Teil der Pyrogenität blieb also nach dieser Behandlung erhalten. Die für das 2-Mercaptoäthanol zugänglichen Disulfidbrücken spielen demnach für diese biologische Wirkung des Moleküls keine Rolle.
Da es sich bei den bakteriellen Endotoxinen um Lipopolysaccharide handelt, sollte geprüft werden, ob auch bei dem endogenen Pyrogen Polysaccharide (in Form eines Glykoproteids) eine fiebererzeugende Rolle spielen.

Perjodat

Der Kontrollansatz ohne Pyrogen ergab im Kaninchentest kein Fieber. Der Pyrogenwert der Ausgangslösung betrug als Mit-

telwert von zwei Tieren 9,3 cm^2. Nach der Perjodateinwirkung ergab sich ein Mittelwert von 8,3 cm^2. Die Pyrogenität blieb nach der Perjodat-Zuckerspaltung somit weitgehend - im Gegensatz zu den bakteriellen Endotoxinen - erhalten.
Es ist bekannt, daß oberflächenaktive Substanzen wie z.B. Natrium-desoxycholat die Pyrogenität der Endotoxine (Lipopolysaccharide) zerstören. Es sollte daher untersucht werden, ob sich das endogene Pyrogen und die Endotoxine auch hierin unterscheiden.

Natrium-desoxycholat

Die Natrium-desoxycholat-Pufferlösung zeigte allein kein Fieber (die Lösung muß sehr langsam gespritzt werden). Ausgehend von einer Pyrogenlösung mit FI_{2h} = 13 cm^2 (gemessen nach der Vergleichsdialyse) ergab sich im behandelten Parallelansatz nach der Dialyse ein FI_{2h}-Wert von etwa 1,5 cm^2. Die Pyrogenität wurde also analog zu den Endotoxinen der Bakterien zerstört. Tertiär- und Sekundär-Struktur des Eiweißmoleküls dürften demnach fur die Fieberwirkung mit von ausschlaggebender Bedeutung sein.

Trypsin

Bei normalen Kontrollwerten wurde die Pyrogenität durch tryptische Spaltung völlig zerstört. In der Abbildung 34 ist die Temperaturkurve vor und nach der Trypsinbehandlung dargestellt. Der Fieberindex sank von 7,5 cm^2 auf 2,5 cm^2.

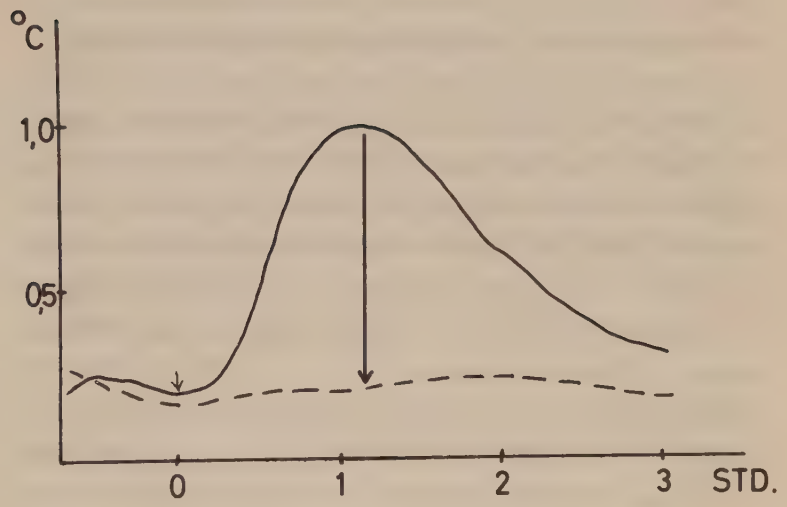

Abbildung 34 : Fieberkurven vor und nach Trypsinbehandlung des endogenen Pyrogens

_____ Temperaturkurve des Kaninchens mit unbehandelter Pyrogenlösung (↓ = intravenöse Injektion von 5 ml).

- - - - Temperaturkurve des Kaninchens mit behandelter Pyrogenlösung (↓ = intravenöse Injektion von 5 ml).

Pepsin

Die Pepsinverdauung des endogenen Pyrogens verlief analog zu der Trypsinspaltung. Der Fieberindex sank hierbei von 8,0 cm^2 für die Ausgangslösung auf 3,0 cm^2 für die inkubierte Pyrogenlösung. Das endogene (virusinduzierte) Leukozytenpyrogen wird nach diesen Befunden durch Trypsin und Pepsin zerstört. Dieses Verhalten entspricht den Angaben von WOOD et al. (112) beim Thermo-Pyrogen (nicht durch einen speziellen Induktor, sondern durch längere Inkubation bei 37^o aus Leukozyten gewonnenes Pyrogen).
Im Hinblick auf den Lipidgehalt der Endotoxine wurde ferner geprüft, ob auch beim endogenen Pyrogen ein Lipidanteil für die Wirkung verantwortlich ist.

Pankreaslipase

Der Kontrollversuch mit der Enzym-Pufferlösung ergab im Kaninchentest kein Fieber. Der Fieberindex der Pyrogenlösung betrug auch nach der Enzymeinwirkung unverändert 14,5 cm^2. Der Fieberstoff wird durch Pankreaslipase nicht angegriffen.

Phospholipase

Gegenüber dem enzymlosen Parallelansatz hatte sich der Fieberindex FI_{2h} von 11 aus 12 cm^2 verändert. Ein Abbau des endogenen Pyrogens findet demnach nicht statt.

VI. Vergleiche des physiko-chemischen Verhaltens von Granulozytenpyrogen und Interferon

Wie die vorausgehend geschilderten Versuche zeigen, stellt das endogene Granulozytenpyrogen ein hitze- und desoxycholat=empfindliches Protein bzw. Proteid dar. Da die virusindu=zierten Interferone ebenfalls Proteincharakter besitzen, war es daher interessant zu prüfen, inwieweit Ähnlichkeiten zwischen diesen beiden Wirkstoffen bestehen oder ob sie so=gar identisch sind.

Die zusammen mit KOHLHAGE in unserem Institut durchgeführten Versuche ergaben, daß sich Interferon und Pyrogen durch eine Äthanolfraktionierung trennen lassen (Tabelle 2).

BEZEICHNUNG	ÄTHANOL %	mg	FI_{2h}	FI_{2h}/mg	INTERFERON	AUSBEUTE
LÖSUNG	0	200	102	0,5	1: 40 000	17,0 %
FRAKTION 1	20	103	0	0	1: 3 200	8,6 %
FRAKTION 2	40	44	0	0	0	3,7 %
FRAKTION 3	60	14	34	2,5	0	1,1 %
FRAKTION 4	80	4,8	134	28	0	0,4 %
ÜBERSTAND	80	31	30	1	0	2,8 %

Tabelle 2: Äthanolfraktionierung eines Granulozyten-Zentri=fugenüberstandes. Inkubationsansatz: 0,9 x 10^{10} Granulozyten (aus 6 Kaninchen) + 12 000 HE Newcastle disease Virus, 3 Stunden bei 37°; Ultrazentrifugation 2 Stunden bei etwa 80 000 g.

Von den etwa 1200 mg Trockengewicht der Zellen befinden sich nach der Zentrifugation im Überstand 200 mg. Diese Substanzmenge verteilt sich bei der Äthanolfraktionierung entsprechend den in Tabelle 2 angegebenen Werten. Beim Interferontiter fällt auf, daß er bei der Fällung - wohl auf Grund einer Äthanolempfindlichkeit des Interferons - stark abnimmt.

D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Wenn man die Auseinandersetzung zwischen Myxovirus und Leukozyt beurteilen will, muß man wissen, ob und in welcher Weise die Viruspartikel von der Zelle aufgenommen werden, was dort mit ihnen geschieht und wie die Wirtszelle auf den Zellparasit reagiert.

Über die Aufnahme von Myxoviren in Granulozyten und deren morphologisches Verhalten liegen jedoch keinerlei Erfahrungen vor. Deshalb wurde die Frage elektronen- und phasenkontrast-mikroskopisch geprüft.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Adsorption, Penetration und Eklipse des Newcastle disease Virus haben gezeigt, daß die Viria rasch an die Zellwand der Kaninchengranulozyten gebunden und in wenigen Minuten durch Einstülpung der Membran in die Zellen aufgenommen werden. Diese Befunde stimmen mit Beobachtungen von MUSSGAY und WEIBEL (103) an anderen Zellen überein, wonach Myxoviren in toto in Form der Pinozytose (Viropexis) aufgenommen werden. Sie konnten 30 Minuten nach der Infektion von Hühnerembryonen mit Newcastle disease Virus noch intakte Viruspartikel im Zytoplasma feststellen.

Bei der Anheftung der Myxoviren an die Zellmembran spielt offenbar die Neuraminidase eine wichtige Rolle, indem sie mit denglykoproteidhaltigen Rezeptoren der Zellmembran eine Enzym-Substrat-Bindung eingeht. Deshalb verhindert die Behandlung der Zellen mit Neuraminidase eine Infektion mit Influenzaviren (49).

Die Viria befanden sich nach der Viropexis einzeln oder zu mehreren in Vakuolen (Phagosomen) der Zelle. In dieser Phase können nach Aufschluß der Membranen noch infektiöse Viruspartikel nachgewiesen werden (98). Beim Übergang in die Eklipse wird, wie Untersuchungen mit radioaktiv markierten Viria zeigten (156), die nucleinsäurehaltige Innenkomponente (g-Antigen) in Freiheit gesetzt. In den Vakuolen erfolgen starke morphologische Veränderungen des Virions. ALLISON und MALUCCI (5) nehmen an, daß lysosomale Enzyme in diese Phagosomen abgegeben werden und zur Zerlegung der Virusparti=kel führen. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden (1), daß eines der Pockenvirus-"uncoating"-Enzyme von ABEL (1) auch in normalen Zellen vorhanden ist und eine lysosomale Pro=tease zu sein scheint. Sicher sind die Art und der Umfang der Enzymeinwirkung auf das Virion mit dafür entscheidend, ob es zu einer Virusvermehrung kommt oder nicht. Wie Unter=suchungen von SHU aus unserem Arbeitskreis ergaben, findet offensichtlich keine Vermehrung der Myxoviren in Kaninchen=granulozyten statt, vielmehr werden sie durch zelleigene Enzyme abgebaut (128). Für die Beurteilung der weiteren Untersuchungsergebnisse ist diese Feststellung von Bedeu=tung, weil sie zeigt, daß das eingedrungene Virus die Wirts=zelle in vielfältiger Hinsicht beeinflussen kann, selbst wenn seine Neusynthese ausbleibt.

Morphologisch sind im Phasenkontrastmikroskop bereits nach 5-10 Minuten deutliche Strukturveränderungen und Zellschä=digungen zu beobachten. Diese Veränderungen waren den ange=wandten Viruskonzentrationen proportional. Bei Kontrollver=suchen ohne Virus ließen die Granulozyten bei 37° auch nach

einer Stunde noch keine morphologischen Veränderungen erkennen.

Über den Stoffwechsel der normalen Leukozyten liegt in der Literatur eine große Zahl von Untersuchungen vor. Die älteren Arbeiten sind allerdings nur bedingt verwertbar, weil zum größten Teil mit Zellgemischen ("Leukozyten") (sowie bis zu je 20 Vol% Thrombozyten und Erythrozyten) gearbeitet wurde. Aber auch die neueren Ergebnisse sind zum Teil recht widersprüchlich. So schreibt SEELICH in der "Physiologie und Physiopathologie der weißen Blutzellen" (124): "Auch die Untersuchungen der letzten Jahre, für die Erfahrungen vieler Vorgänger zur Verfügung standen, führten nicht zu einheitlichen Befunden. Ursache dieser Differenzen ist wohl in erster Linie die Labilität der Leukozyten, deren Resistenz gegenüber Änderungen des Milieus oder mechanischen Beanspruchungen viel geringer ist als die anderer Zellen."

Über den Einfluß von Myxoviren an dem Leukozytenstoffwechsel liegen nur die Untersuchungen von FISHER und GINSBERG (51, 52) vor. Sie beschrieben eine Abnahme der Glykolyse bei polymorphkernigen Meerschweinchenleukozyten nach Zugabe von Influenzaviren A PR-8 oder B Lee. Diese Arbeit geht allerdings von einer anderen Fragestellung aus und enthält Reaktionsbedingungen,die mit den vorliegenden nicht verglichen werden können. So wurden die Viren vor der Glykolysemessung, die im Warburggerät erfolgte, 30 Minuten bei 4° und Anwesenheit von Ca-Ionen an die Meerschweinchengranulozyten adsorbiert. Ohne zusätzliche Ca-Ionen soll die Virusadsorption ausgeblieben sein, ein Befund, der im Gegensatz zu unseren Ergebnissen steht. Um die Glykolysereduktion zu erzielen,

mußte mit der 4-12fachen Virusmenge gearbeitet werden. Die Zellen wurden nach der Virusadsorption abzentrifugiert und in einen 0,85%igen KCL-$NaHCO_3$-Phosphatpuffer aufgenommen. Nach 90 Minuten im Warburgapparat erfolgte die chemische Bestimmung der gebildeten Milchsäure.

Unsere Versuche zeigen, daß der Stoffwechsel der frisch isolierten Granulozyten bereits nach 180 Minuten zum Stillstand kommt. Durch den Zusatz von 20 mg D-Glucose pro 5 x 10^8 Zellen (Suspensionsvolumen 70 ml) konnte dagegen der Stoffwechsel über 6 Stunden unverändert gehalten werden. Weitere Zusätze waren für eine normale Atmung und Glykolyse nicht erforderlich. Damit lag ein einfaches, gut reproduzierbares Reaktionsmilieu vor, das die Voraussetzung für die nachfolgenden Stoffwechseluntersuchungen darstellte. Die neu eingeführte Methode der direkten Titration der entstehenden Milchsäure bewährte sich. Hierbei hat die Bestimmung am Autotitrator neben der Pufferfreiheit den Vorteil, nicht nur einige Meßpunkte, sondern eine kontinuierliche Meßkurve zu liefern. Es wird ferner nicht der Reaktionsablauf durch die Messung, wie bei einer chemischen Bestimmung, beendet. Kontrollbestimmungen der Milchsäure auf enzymatischem Wege ergaben, daß dieses Verfahren zu richtigen Milchsäuredaten führt. Eventuell gebildetes Kohlendioxyd des Zitronensäurezyklus wird bei pH 7,4 (K_s-Wert der Kohlensäure 4,5 x 10^7) noch nicht erfaßt.

Aus den Versuchen zur Zellatmung und Glykolyse geht eindeutig hervor, daß das Newcastle disease Virus den Stoffwechsel der Granulozyten deutlich, das Influenzavirus jedoch nur geringfügig beeinflußt. Im Gegensatz zur Phagozytose von

Bakterien sind nach der Virusaufnahme die Atmungs- und Glykolysewerte nicht erhöht (70), sondern erniedrigt. Da andererseits phagozytierte Tuschepartikel (70) sowie hitzeinaktivierte Viria die Atmung und Glykolyse nicht beeinträchtigen, muß es sich bei den untersuchten Stoffwechseländerungen um virusspezifische Vorgänge handeln.

Auffallend an den Ergebnissen ist die Tatsache, daß besonders die Meßkurve der Glykolyse nach Viruszugabe bereits innerhalb von etwa 10 Minuten abknickte. Diese Beobachtung weist darauf hin, daß sich der Einfluß auf den Stoffwechsel sehr schnell nach Viruspenetration, bereits in der Eklipse geltend macht. Zu einem Zeitpunkt also, bei dem eine Virussynthese noch nicht eingetreten sein kann. Diese rasche Zellwirkung ist nicht verwunderlich, weil die Viruspartikel bereits nach 3 Minuten in der Zelle angetroffen werden. Da das Virus/Zellverhältnis bei den Ansätzen zum Teil nur 10:1 betrug, muß es sich um eine sehr empfindliche Zellwirkung handeln.

In diesem Zusammenhang tauchte deshalb die Frage auf, ob das Virus als Gesamtpartikel in vermehrungsfähiger oder auch in inaktivierter Form oder durch bestimmte Untereinheiten auf den Granulozyten einwirkt. Das wärmeinaktivierte und das ätherbehandelte, in Untereinheiten gespaltene Newcastle disease Virus zeigte keine Wirkung mehr. Das Haemagglutinin und die Virusneuraminidase scheinen für die Beeinflussung der Stoffwechselvorgänge nicht verantwortlich zu sein, weil die Neuraminidaseaktivität bei der Ätherbehandlung zu über 90% erhalten bleibt*) und sich der HA-Titer sogar noch er-

*) Dr. R.DRZENJEK; Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen; Private Mitteilung.

höht. Auch die durch Phenol/Natriumdodecylsulfat isolierte Ribonucleinsäure aus etwa 30 000 HE Newcastle disease Virus erwies sich hinsichtlich des Zellstoffwechsels als inaktiv. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muß man allerdings berücksichtigen, daß die Isolierung der Ribonucleinsäure aus Newcastle disease Virus in infektiöser Form bis heute noch nicht gelungen ist. Deshalb läßt dieses Versuchsergebnis bestenfalls den Schluß zu, daß auch die nicht infektiöse Nucleinsäure inaktiv sei.

Die Ergebnisse der Iminochinon-Behandlung von Newcastle disease Virus weisen darauf hin, daß die Nucleinsäure nicht für die Veränderung des Zellstoffwechsels verantwortlich sein kann. Unterhalb pH 7 reagiert diese Substanz mit Nucleinsäuren, nicht dagegen mit Proteinen (120). Man nimmt an, daß das Chinon unter Aufsprengung des Äthylenringes bifunktionell mit Phosphorsäurediestern zu Triestern reagiert. Diese sind instabil und zerfallen unter Kettenbruch der Nucleinsäure.

Die Untersuchungen weisen vielmehr darauf hin, daß das für die Zellwirkung entscheidende Prinzip ein Lipid oder Lipoproteid sein dürfte. Das hochwirksame Newcastle disease Virus enthält 27% Lipid, das schwächere Influenzavirus A PR-8 dagegen nur 18%. Auch besitzen alle bisher beobachteten pyrogenen Viren Lipide. Hierin besteht Übereinstimmung mit der Feststellung von SIEGERT et al. (131), daß die Induktion des endogenen Fieberstoffes durch Lipoproteine der Myxoviren erfolgt.

Charakteristisch für die polymorphkernigen Leukozyten ist die Anwesenheit zahlreicher anfärbbarer Granula. Obwohl diese Strukturen bereits seit 1879 durch EHRLICH (45) bekannt sind,

ist bis heute nur wenig über ihren Aufbau und ihre Funktion bekannt. Die besonders enzymreichen, mit einer Lipoprotein=membran versehenen Partikel der granulären Zellbestandteile werden heute als Lysosomen bezeichnet. Da die Granulozyten reich an diesen enzymaktiven Partikeln sind, wurde in der vorliegenden Arbeit besonders eingehend die virusinduzierte Enzymausschüttung der Granulozyten und der daraus gewonnenen Granulä untersucht.

Folgende Enzymgruppen-Aktivitäten konnten in Leukozyten nach=gewiesen werden: Lipase/Esterase (63,67,104,118,123), Kata=lase (33,76,86,115), Nucleotidase (144), Phosphorylase (74, 158), Lactatdehydrogenase (42,43), Cholinesterase (41,69,105), Phosphodiesterase (7), alkalische und saure Phosphatase (21, 23,29,38,50,57,66,77,79,85,147), Peptidase (37,55,56,75), Peroxydase (2,3,8,115,121), Sulfatase (18) und Lysozym (6, 53). Der größte Teil der Nachweise basiert auf histochemi=schen Methoden, so daß eine Übertragung der Ergebnisse nicht ohne weiteres möglich ist. Die Versuche wurden zum größten Teil an Humanleukozyten durchgeführt. Eine Differenzierung des Begriffes "Leukozyt" unterblieb in den meisten Fällen.

Die parallel mit den Stoffwechseluntersuchungen durchgeführ=ten Enzymbestimmungen zeigen, daß unter dem Einfluß von New-castle disease Virus die folgenden Fermente von den Kanin=chengranulozyten vermehrt abgegeben werden: Lactatdehydro=genase, alkalische Phosphatase und Lysozym. Die Versuche an isolierten Leukozytengranula ergaben ebenfalls eine vermehrte virusinduzierte Aktivitätausschüttung an Lactatdehydrogenase und Lysozym. Die Tatsache, daß sie durch Antiserum gehemmt

werden kann, weist auf die Spezifität der Reaktion hin. Bei der Lipase/Esterase, der sauren Phosphatase und Peroxydase konnte dagegen unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine Ausschüttung beobachtet werden. Das Auftreten der erhöhten Enzymaktivitäten im Außenmedium geht den Änderungen der Atmung und Glykolyse parallel. Besonders bei der alkalischen Phosphatase wurde kurze Zeit nach der Viruszugabe bereits 54% der durch Ultraschall freisetzbaren Enzymaktivität in das Medium abgegeben. Bei Lysozym waren es 30%, bei der Lactatdehydrogenase 20%.

Da die abgegebenen Enzyme zum größten Teil von den Lysosomen der Granulozyten stammen, dürfte für deren Freisetzung eine Zerstörung der Lysosomen-Phospholipidhülle von entscheidender Bedeutung sein, worauf auch die Ergebnisse mit isolierten Granula hinweisen. Es besteht durchaus die Möglichkeit, daß die virusinduzierte Überschwemmung des Cytoplasmas mit lysosomalen Enzymen für die Verminderung der Zellatmung und Glykolyse verantwortlich ist.

Zusammen mit den beschriebenen Enzymen wird unter dem Virus-einfluß auch endogenes Pyrogen von den Granulozyten abgegeben. Es handelt sich hierbei um ein basisches Protein, das analog dem von WOOD et al. (112) beschriebenen Thermopyrogen trypsin- und pepsinempfindlich ist und sich durch Trichloressigsäure sowie Ammoniumsulfat ausfällen läßt. Im Gegensatz zum Thermopyrogen besitzt das virusinduzierte, endogene Pyrogen nicht ein Molekulargewicht von 10 000 - 20 000 (112), sondern von 30 000 - 40 000. Ferner wird das virusinduzierte Pyrogen etwa um den Faktor 8-10 schneller abgegeben als das nicht-virusinduzierte. Das Molekulargewicht des Thermopyro-

gens wurde von WOOD et al. durch Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation ermittelt. Das in der vorliegenden Arbeit angegebene Molekulargewicht des endogenen Pyrogens bezieht sich auf die Gelsäulenchromatographie, Ultrafiltration sowie Membranosmometermethode. Es kann zur Zeit allerdings nicht entschieden werden, ob es sich bei der Molekulargewichtsdifferenz um einen methodisch bedingten Unterschied handelt. Man darf aber durchaus annehmen, daß es hinsichtlich des Molekulargewichtes verschiedene Pyrogene gibt, da wir inzwischen mit BIOGEL P-100 Säulen zeigen konnten, daß das durch Newcastle disease Virus induzierte Serumpyrogen (in vivo) ein Molekulargewicht von 50 000 - 70 000 besitzt (92).
Die Arbeitsgruppe von ATKINS (15) hat zum ersten Mal eine durch Virus (Parainfluenza-5) in vitro induzierte Pyrogenausschüttung beschrieben. Es werden allerdings keine Angaben über die verwendete Viruszellrelation gemacht. Die Untersuchungen erfolgten mit "Blutzellen" von Kaninchen, so daß eine genaue Angabe über die an der Reaktion beteili gten Zellarten nicht möglich ist. Auch wurde das gebildete endogene Pyrogen nicht isoliert und charakterisiert. Es wäre interessant zu prüfen, ob die durch Influenzavirus A PR-8 oder Newcastle disease Virus induzierten und die aus anderen Zellen stammenden Fieberstoffe identisch sind. In der vorliegenden Arbeit kann zwischen dem durch Influenzavirus A PR-8 und dem durch Newcastle disease Virus freigewordenen endogenen Pyrogen kein Unterschied festgestellt werden.

Nach Entdeckung des Interferons durch ISAACS und LINDENMANN 1957 (78) zeigte sich, daß zahlreiche Viren in der Lage sind, die Bildung dieses Virushemmstoffes in geeigneten

Wirten oder Zellsystemen zu induzieren. Unter den Interferon induzierenden Viren stammen die meisten und aktivsten aus der Gruppe der Myxo- und Arboviren (71). Es ergab sich daher als weitere Möglichkeit, in dem System Myxoviren/Granulozyt auch die Freisetzung dieses Wirkstoffes zu untersuchen, zumal beim Kaninchen die Ausschüttung von Pyrogen und Interferon in das Serum zeitlich parallel verläuft, was zuerst unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen hat (129).

In diesem Zusammenhang war die Frage zu beantworten, ob beide aus Leukozyten stammenden Wirkstoffe identisch sind.

Die zusammen mit KOHLHAGE durchgeführten Vergleiche zwischen endogenem Pyrogen und Interferon mit Hilfe der Äthanolfraktionierung und Gelsäulenchromatographie ergaben, daß beide, vom Newcastle disease Virus induzierten Stoffe nicht identisch sind (93).

Im Gegensatz zum Interferon läßt sich das endogene Pyrogen bei der Äthanolfraktionierung um den Faktor 56 konzentrieren, bezogen auf den ultrazentrifugierten Überstand.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß das Newcastle disease Virus innerhalb weniger Minuten von Granulozyten adsorbiert, in toto aufgenommen und in Vakuolen (Phagosomen) abgebaut wird, jedoch bleibt eine Vermehrung aus.

Phasenkontrastmikroskopisch wurden bereits nach 5 Minuten virusbedingte Strukturveränderungen und Schädigungen der Granulozyten beobachtet.

Die normale Atmung und Glykolyse der Zellen konnten nach Zugabe von Glukose bis zu 6 Stunden ohne nachweisbare Veränderungen gemessen werden. Ohne Glukosezusatz betrug der Stoffwechsel dagegen nur etwa 60% des optimalen und kam nach 3 Stunden zum Stillstand.

Für die Glykolysemessung wurde eine direkte Titration der gebildeten Milchsäure am Autotitrator ausgearbeitet, da die Messungen im Warburggerät unbefriedigend blieben. Neben der Pufferfreiheit besitzt diese direkte Titration den großen Vorteil, daß sie den Reaktionsablauf nicht wie bei der chemischen Bestimmung der Milchsäure beendet, sondern eine Meßkurve ermöglicht.

Nach Zugabe von Newcastle disease Virus zur Zellsuspension verringerte sich, im Gegensatz zum Influenzavirus A PR-8, die Atmung um etwa 25%.

Die Glykolyse wurde durch das Influenzavirus A PR-8 um durchschnittlich 10% vermindert. Das Newcastle disease Virus führte dagegen zu einer Glykolyseabnahme um etwa 75%.

Nach Wärmebehandlung (25 Minuten bei 56°) oder Ätherspal= tung konnten die Viren den Zellstoffwechsel nicht mehr be= einflussen. Auch phenolextrahierte Ribonucleinsäure des Newcastle disease Virus sowie Neuraminidase aus vibrio cho- lerae blieben hinsichtlich Atmung und Glykolyse unwirksam. Mit Iminochinon (BAYER A 139) behandeltes Newcastle disease Virus war dagegen noch voll aktiv. Da das Chinon nur die Nucleinsäure, nicht aber das Protein angreift, kann die Virusnucleinsäure nicht für die Stoffwechselveränderungen des Granulozyten verantwortlich sein. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß sich das Virus in diesen Zellen nicht vermehrt.

Mit der virusbedingten Verringerung der Zellatmung und Glykolyse geht eine erhöhte Ausschüttung von Lactatdehydro= genase, saurer Phosphatase und Lysozym einher. So wurde die Lactatdehydrogenase-Aktivität von 66 mU/ml auf 134 mU/ ml, die Aktivität der alkalischen Phosphatase von 5,2 mU/ml auf 14,0 mU/ml und die Lysozymmenge von 2,0 µg/ml auf 3,3 µg/ml gesteigert.

Wurden anstelle der Granulozyten die daraus isolierten Gra= nula mit Virus inkubiert, so kam es bei der Lactatdehydro= genase und dem Lysozym zu einer analogen Steigerung der Enzymausschüttung. Dieser Enzymanstieg konnte durch Zugabe von spezifischem Antiserum gegen das Virus weitgehend ge= hemmt werden.

Gleichzeitig mit der Änderung der Enzymausschüttung erfolgte die Abgabe des endogenen Pyrogens. Allerdings ist der Ka=ninchentest zur Messung der Pyrogenität nicht so empfind= lich wie die Atmungs-, Glykolyse-, Interferon- und Enzym=

messungen. Die größte Pyrogenmenge wurde daher erst 2-3 Stunden nach Viruszugabe gemessen. Ohne eine Virusinduktion wird die entsprechende Pyrogenmenge (Thermo-Pyrogen) sogar erst nach einer Inkubationszeit von etwa 24 Stunden erreicht.

Das virusinduzierte endogene Pyrogen wurde säulenchromatographisch sowie durch fraktionierte Fällung und Ultrafiltration isoliert. Für die Säulenchromatographie mußte ein spezieller Fraktionssammler (B.BRAUN, fractionator simplex) entwickelt werden, der ein Arbeiten unter sterilen und apyrogenen Bedingungen erlaubt. Die Bestimmung des Molekulargewichtes auf Sephadex- und Biogelsäulen, in der Ultrafiltration sowie im Membranosmometer ergab einen Wert von 30 000 - 40 000.

Das endogene Pyrogen erwies sich als wärme-, trypsin- und pepsin-empfindlich. 2-Mercaptoäthanol zerstörte die Fieberwirkung der Substanz nicht. Dagegen wurde das endogene Pyrogen durch eine Behandlung mit Na-desoxycholat oder Chloromercuribenzoat inaktiviert. Der letzte Befund spricht dafür, daß SH-Gruppen für die fiebererzeugende Aktivität mit entscheidend sind. Dagegen dürften zumindest die an der Proteinoberfläche liegenden SS-Brücken für die biologische Wirkung bedeutungslos sein. Die Wirkungslosigkeit einer Perjodatbehandlung weist darauf hin, daß für die pyrogene Aktivität keine Polysaccharide erforderlich sind. Dafür spricht auch, daß der sekundäre Fieberstoff, im Gegensatz zu den bakteriellen Endotoxinen durch Erhitzen inaktiviert wird. Pankreaslipase oder Phospholipase beeinträchtigen die Pyrogenität nicht.

Die Freisetzung des virusinduzierten Pyrogens erfolgte etwa um den Faktor 8-10 schneller als die des thermoaktivierten Pyrogens.

Fällungsversuche und säulenchromatographische Untersuchungen zeigten, daß das von Granulozyten unter Viruseinfluß gleichzeitig abgegebene Interferon nicht mit dem endogenen Pyrogen identisch ist. Ferner besitzt das in vivo im Kaninchenserum durch Newcastle disease Virus induzierte Pyrogen im Gegensatz zu dem in vitro, aus isolierten Granulozyten gewonnenen ein Molekulargewicht von 50 000 - 70 000. Es scheinen demnach, ähnlich wie bei den Interferonen, mehrere chemisch verwandte, endogene Pyrogene zu existieren.

F. LITERATUR

1) ABEL,P.: Reaktivation of heated vaccinia virus in vitro. Zschr. Vererbungslehre 94: 249 (1963)

2) AGNER,K.: Verdoperoxidase. A ferment isolated from leucocytes.
Acta physiol. Scand. 2: suppl.8; 1-62 (1941)

3) AGNER,K.: Verdoperoxidase.
Advances Enzymol. N.Y. 3: 137-148 (1943)

4) ALLISON,A.C., SANDELIN,K.: Activation of lysosomal enzymes in virus-infected cells and its possible relationship to cytopathic effets.
J. Exper. Med. 117: 879-887 (1963)

5) ALLISON,A.C., MALLUCCI,L.: Histochemical studies of lysosomes and lysosomal enzymes in virus-infected cell cultures.
J. Exper. Med. 121: 463-467 (1965)

6) AMANO,T., INAI,S., SEKI,J., KASHIRA,S., FUJIKAWA,K., NISHIMURA,S.: Studies on the immune bacteriolysis.
I. Acceleration effect on the immune bacteriolysis by lysozyme-like substance of leucocytes and egg-white lysozyme.
Med. J. Osaka Univ. 4: 401 (1954)

7) ANDERSON,E.P., HEPPEL,A.L.: Purification and properties of a leucemic cell phosphodiesterase.
Biochim. biophysica acta, N.Y. 43: 79-89 (1960)

8) ARCHER,G.T.: Release of peroxidase from eosinophil-granulas in vitro.
Nature 194: 937-974 (1962)

9) ATKINS,F., WOOD,W.B.: The presence of transferable pyrogen in the blood stram following the injection of typhoid vaccine.
J. Exper. Med. 101: 519-528 (1955)

10) ATKINS,E., WOOD,W.B.: Identification of an endogenous pyrogen in the blood stream following the injection of typhoid vaccine.
J. Exper. Med. 102: 499-516 (1955)

11) ATKINS,E., HUANG,W.CH.: The appearance of an endogenous pyrogen in the blood following the intravenous injection of virus.
J. Exper. Med. 107: 383-401 (1958)

12) ATKINS,E. HUANG,W.CH: Theeffect of endogenous pyrogen in the normal and virus-tolerant recipients.
J. Exper. Med. 107: 403-414 (1958)

13) ATKINS,E., HUANG,W.CH: The relation of tolerance to the production of endogenous pyrogen.
J. Exper. Med. 107: 415-435 (1958)

14) ATKINS,E., SNELL,E.S.: Bacterial endotoxins, H.Landy and W.Braun eds.
Rudges Univ. Press. New Brunswick, N.J. 1964: 134

15) ATKINS,E., CRONIN,M., ISACSON,P.: Endogenous pyrogen release from rabbit blood cells incubated in vitro with parainfluenza virus-5 (DA-strain).
Science 146: 1496-1497 (1964)

16) ATKINS,E.: "Annotation"
Yale J. Biol. 38: 544-549 (1966)

17) ATKINS,E., MORSE,S.I.: Studies in Staphylococcal Fever. VI. Responses induced by cell walls and various fractions of staphylococci and their products.
Yale J. Biol. 39: 279 (1967)

18) AUSTIN,J.H., BISCHEL,M.: A histochemical method for sulfatase activity in hemic cells and organ imprints.
Blood 17: 216-244 (1961)

19) BAKKER,A.: Einige Übereinstimmung im Stoffwechsel der Carcinomzellen und Exsudatleukozyten.
Klin. Wschr. 6: 252-254 (1927)

20) BALDRIGE,C.W. and GERHARD,R.W.: The extra respiration of phagocytis.
Amer. J. Physiol. 103: 235-236 (1933)

21) BARNES,J.M.: The enzymes of lymphocytes and polymorphnuclear leucocytes.
Brit. J. Exper. Path. 21: 261-265 (1940)

22) BECK,W.S. and VALENTIN,W.N.: The carbohydrate metabolism of leucocytes.
Cancer Res. 13: 309-317 (1953)

23) BECK,W.S. and VALENTIN,W.N.: Biochemical studies on leucocytes. II. Phosphatase activity in chronic lymphatic leucemia, acute leucemia and miscellaneous hamatologic conditions.
J. Laborat. Clin. Med. 38: 245 (1951)

24) BENNETT,J.L., WAGNER,R.R., LE QUIRE,V.S.: The production of fever by influenza viruses. II. Tolerance in rabbits to the pyrogenic effect of influenza viruses.
J. Exper. Med. 90: 335-347 (1949)

25) BENNETT,J.L., WAGNER,R.R., Le QUIRE,V.S.: Pyrogenicity of influenca virus in rabbits.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 71: 132 (1949)

26) BERLIN,R.D., WOOD,W.B.: Studies on the pathogenesis of fever. XII. Electrolytic factors influencing the release of endogenous pyrogen from polymorphnuclear leucocytes.
J. Exper. Med. 119: 697-714 (1964)

27) BENNET,J.L., BEESON,P.B.: The properties and biological effects of bacterial pyrogens.
Medicine 29: 365 (1950)

28) BERTHRONG,M., CLUFF,L.E.: Studies of the effect of bacterial endotoxins on rabbit leucocytes.
J. Exper. Med. 98: 331-348/349-364 (1953)

29) BODANSKY,O.: Blood enzymes in cancer and other diseases. Advan. Cancer Res. 6: 1 (1961)

30) BORNSTEIN,P.L., BREDENBERG,C., WOOD,W.B.: Quantitative features of the febrile response to leucocytic pyrogen. J. Exper. Med. 117: 349 (1963)

31) BRAUDE,A.J., CAREY,F.J., ZALESKY,M.: Studies with radioactiv endotoxin. II. Correlation of physiologic effects with distribution of radioactivity in rabbits injected with lethal dosis of E.coli endotoxin labelled. J. Clin. Invest. 34: 858-866 (1955)

32) BRAUNSTEINER,H.: Physiologie und Physiopathologie der weißen Blutzellen. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 151-169 (1959)

33) CHANCE,B.: On the reaction of catalase peroxidase with acceptores. J. Biol. Chem. 182: 649-658 (1950)

34) COHN,Z.A., HIRSCH,J.G.: The isolation and properties of specific cytoplasmic granulas of rabbit polymorphonuclear leucocytes. J. Exper. Med. 112: 983 (1960)

35) COHN,Z.A., HIRSCH,J.G.: The influence of phygocytosis on the intercellular distribution of granula-associated components of polymorphonuclear leucocytes. J. Exper. Med. 112: 1015 (1960)

36) COLLINS,R.D., WOOD,W.B.: The interaction of leucocytes and endotoxine in vitro. J. Exper. Med. 110: 1005-1016 (1959)

37) COOKE,J.V.: Proteolytic leucocytic enzyme in leukemia. Arch. Internal. Med. 49: 836-845 (1932)

38) CRAM,D.M., ROSSITER,R.J.: Pohsphatase of rabbit polymorphonuclear leucocytes. Cancer, N.Y. 27: 290-298 (1949)

39) DALES,S., CHOPPIN,P.W.: Attachment and penetration of influenza virus.
Virology 18: 489-493 (1962)

40) DAVIES,P., BARRY,R.D.: Nucleic acid of influenza virus.
Nature 211: 384-387 (1966)

41) DENNY,H., HAGERMANN,D.D.: Cholinesterase activity of human leucocytes.
Science 123: 987-988 (1956)

42) DIOGUARDI,N., AGOSTONI,A., FOIRELLI,G.: Characterisation of lactic dehydrogenase in cells of myeloid leukemia.
Enzym. Biol. Clin. 2: 116 (1962-1963)

43) DIOGUARDI,N., AGOSTONI,A. FIORELLI,G. LOMONT,A.B.: Characterisation of lactic dehydrogenase of normal human granulozytes.
J. Laborat. Clin. Med. 61: 713-716 (1963)

44) ESTES,F.L., AUSTIN,N.S., GASTH,J.H.: Metabolic characterization of polymorphonuclear leucocytes.
Clin. Chem. 6: 501-513 (1960)

45) EHRLICH,P.: Über die spezifische Granulation des Blutes.
Arch. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. (1879)

46) FALLON,M.J., FREI,F., DAVIDSON,II,J.D., TRIER,J.S., BRUKE,D.: Leucocytes preparations from human blood evaluation of their morphologic and metabolic state.
J. Laborat. Clin. Med. 59: 797-799 (1962)

47) FASTIER,L.B.: Taxic manifestations in rabbits and mice associated with the virus of western equine encephalomyelitis.
J. Immunol. 68: 531-541 (1952)

48) FAZEKAS de ST.GROTH: Viropexis, the mechanism of influenza virus infection.
Nature, Lond. 162: 294-295 (1948)

49) FAZEKAS de ST.GROTH: Destruction of influenza virus receptors in the mouse lung by an enzyme from v.cholerae. Austral. J. Exper. Biol. 26: 49 (1948)

50) FIESSINGER,N., BOYER,F.: Les phosphatases des leucocytes. Enzymologia 1: 172 (1936)

51) FISHER,T.N., GINSBERG,H.S.: Reactions of influenza-viruses with guinea pig polymorphonuclear leucocytes. II. The reduction of white blood cell glycolysis by influenza viruses and receptor destroying enzyme (RDE. Virology 2: 637-655 (1956)

52) FISCHER,T.N., GINSBERG,H.S.: III. Studies on the mechanism by which influenza viruses inhibit phagocytosis. Virology 2: 656-664 (1965)

53) FALANGAN,P., LIONETTI,F.: Lysozyme distribution in blood. Blood 10: 497-501 (1955)

54) FLEISCHMANN,W., KUBOWITZ,E.: Über den Stoffwechsel der Leukozyten. Biochem. Zschr. 181: 395-399 (1927)

55) FLEISHER,G.A.: Peptidase in human leucozytes. Ann. N.Y. Acad. Sc. 59: 1012-1018 (1955)

56) FLEISHER,G.A.: Peptidase in human blood, IV. The hydrolysis of glycyl-leucine and other dipeptides by leucocytes. Arch. Biochem. Biophys. 61: 119 (1956)

57) FOLLETTE,J.H., VALENTINE,W.N. and REGNOLDS,J.: A comparison of human leucocyte phosphatase activity towards sodium-ß-glycerophosphate, adenosine- 5-phosphate and glucose-1-phosphate. Blood 14: 415-422 (1959)

58) FRENCH,E.L.: The pyrogenetic effect of the influenza mumps group of Virus in the laboraty rabbit. Austral. J. Exper. Biol. 30: 479 (1952)

59) FUJITA,A.: Über den Stoffwechsel der weißen Blutzellen.
Klin. Wschr. 7: 897-898 (1928)

60) GIFRER,A., SCHRAMM,G.: Infectivity of Ribonucleic Acid from Tobacco Mosaic Virus.
Nature 177: 702- 703 (1956)

61) GILDEMEISTER,E., HILGERS,P.: An welchen Blutbestand= teilen haftet das nach kutaner Impfung des Kaninchens in den Blutkreislauf gelangende Vakzinevirus?
Zbl. Bakt. J. Orig. 117: 258-262 (1930)

62) GILMAN,S.M., BORNSTEIN,D.L., WOOD,W.B.: Further observations of the role of endogenous pyrogen in endotoxin fever.
J. Exper. Med. 114: 722-739 (1962)

63) GINSBERG,R., KOHN,R, NECHLES: Studies on the blood esterase.
Ann. J. Digestive Dis. 4: 154 (1937)

64) GRAFE,E.: Die Steigerung des Stoffwechsels bei chronischer Leukämie und ihre Ursachen.
Dtsch. Arch. klin. Med. 102: 406 (1911)

65) GROSSGEBAUER,K.: Virusbedingtes Fieber.
Klin. Wschr. 45: 749-755 (1967)

66) HAIGHT,W.F., R.J.ROSSITER: Acid and alkaline phosphatase in white cells. Data for the lymphocyte and the polymorphonuclear leucocyt of man and the rabbit.
Blood 5: 267 (1950)

67) HARDIN,E.B., VALENTIN,J.H., FOLLETTE, and LAWRENCE,J.S.: Esterase and Lipase activity of leucocytes and erytrocytes in health and disease.
Amer. J. Med. Sc. 229: (397-402) (1955)

68) HERION,J.C., SPITZNAGEL,J.K., WALKER,R.I. ZEYA,H.I.: Pyrogenicity of granulozyte lysosomes.
Amer. J. Physiol. 211: 693-698 (1966)

69) HINES,B.E.: Acetylcholine esterase of white components of blood.
Nature 170: 78-79 (1952)

70) HIRSCH,J.G., COHN,Z.A.: Degranulation of Polymorphonuclear leucocytes following Phagocytosis of Microorganism.
J. Exper. Med. 112: 1005 (1960)

71) HO,M.: "Interferons" in North-Holland Reasearch Monographs, Frontiers of Biology.
Amsterdam, Vol. 2: 21 (1966)

72) HOHN,TH., POLLMANN,W.: Die Trennung von Nucleinsäure mit Sephadex.
Zschr. Naturforsch. 18b: 919-922 (1963)

73) HOYLE,L.: The release of influenza virus from the infected cell.
J. Hyg. 52: 180-188 (1954)

74) HÜLSMANN,W.C., OFI,T.L., van CLEVLAND,S.: Phosphorylase activity in leucocytes from patients with glycogen storage disease.
Lancet 2: 581-583 (1961)

75) HUSFELDT,E.: Proteolytische Enzyme in den Leukozyten des Menschen.
Zschr. physiol. Chem. 194: 137-165 (1931)

76) ICHIMARU,M.: Studies on leukocyt catalase; especially in leucemic cells.
J. Kyushu Hematol. Sc. 9: 722 (1959)

77) IDNOFF,A.: Total acid phosphatase content of peritoneal leucocytes obtained from 2-trijodothyronine treated guinea pigs.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 110: 372 (1962)

78) ISAACS,A., LINDENMANN: "Interferons".
Proc. Roy. Soc., London, Biol. Sc. 147: 258 (1957)

79) JANOFF,A., CLUSKEY,R.T.: Effect of excess of vitamin A on acid-phosphatase content of guinea pig peritoneal leucocytes.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 110: 586 (1962)

80) KAISER,H.K., WOOD,W.B.: The production of endogenous pyrogen by polymorphonuclear leucocytes.
J. Exper. Med. 115: 2736 (1963)

81) KANOH,S., KAWASAKI,H., YOSHIDA,M., NISHIO,A., MOCHIDA,K.: Some factors influencing the production of leucocytic pyrogen from polymorphonuclear leucocytes in vitro.
Jap. J. Med. Sc. - Pharmacol. 17b: 125 (1967)

82) KARNOVSKY,M.L.: Metabolic shiftes in leucocytes during the phagocytic event. In: Ciba Foundation, Study Group 10, Biological Activity of the leucocytes, edited by G.E.W.Wolstenhome and M.O.Connor.

83) KEMPNER,W.: The nature of leukemic blood cells as determined by their metabolism.
J. Clin. Invest. 18: 291-300 (1939)

84) KARANOVSKY,M.L.: Metabolic basis of phagocytic activity.
Physiol. Rev. 42: 143-168 (1962)

85) KENNY,J.J. and MOLONEY,W.C.: Leucocyte alkaline phosphatase. Behavior during prolonged incubation and infected in normal and leukemic leucocytes.
Blood 12: 295-302 (1957)

86) KIDSON,C.: Variations in catalase activity in human leukocytes.
Blood 19: 82-88 (1962)

87) KING,M.K., WOOD,W.B.: The relation of circulating endogenous pyrogen to the fever of acute bacterial infections.
J. Exper. Med. 107: 305-318 (1958)

88) KING,M.K., WOOD,W.B.: The site of action of leucocytic and circulating endogenous pyrogen.
J. Exper. Med. 107: 291-303 (1958)

89) KING,M.K., WOOD,W.B.: The leucocytic origin of endogenous pyrogen in acute inflammatory exsudates.
J. Exper. Med. 107: 279-289 (1958)

90) KÖHLER,H.: Die Rolle der Leukozyten als Virusträger.
Zbl. Bakt. I. Orig. 180: 140-144 (1960)

91) KÖHLER,H.: Neue Wege bei der Isolierung der Poliomyelitisvirus aus dem Blut an Kinderlähmung erkrankter Menschen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 180: 145-146 (1960)

92) KOHLHAGE,H.: unveröffentlicht.

93) KOHLHAGE,H., POLLMANN,W., SIEGERT,R.: Life Sciences (im Druck) (1968)

94) LEVENE,P.H., MEYER,G.M.: The action of leucocytes on glucose.
J. Biol. Chem. 11: 361-370 (1912)

95) LEVENE,P.H., MEYER,G.M.: On the action of leucocytes on glucose.
J. Biol. Chem. 12: 265-273 (1912)

96) LÖHR,G.W., WALLER,H.D.: Zellstoffwechsel und Zellalterung.
Klin. Wschr. 37: 833-943 (1959)

97) MALLUCI,L., ALLISON,A.C.: Lysosomal enzymes in cells infected with cytophatic and non-cytophatic viruses.
J. Exper. Med. 121: 477-485 (1965)

98) MANDEL,B.: Early stages of virus-cell interaction as studies by using antibody.
Cold. Spr. Harb. Sym. quant. Biol. 27: 123-136 (1962)

99) MARINELARENA,R.: The effects of various chemical substances and bacteria on the glycolytic and respiratory activities of leucocytes.
(Ph.D.Dissertation) Univ. of Michigan 1950

100) MARTIN,S.P., Mc.KINNEY,G.R., GREEN,R., BECKER,C.: Effects of glucose and insulin on the leucocytes of diabetes.
J. Clin. Invest. 32: 1171 (1953)

101) Mc.LEAN,P.: Carbohydrate metabolism of mammary tissues. II. Factors in the regulation of pathways of glucose catabolism in the mammary gland of the rat. Biochim. biophysica acta 37: 296-309 (1960)

102) MOULDER,J.W.: In "The Biochemistry of Intercellular Parasitism", The University of Chicago. 1962

103) MUSSGAY,M., WEIBEL,J.: Early stage of infection with NDV as revealed by electron microscope. Virology 16: 506-509 (1962)

104) NEES,F.: Über die lipolytische Fähigkeit der weißen Blutzellen. Biochem. Zschr. 124: 156-164 (1921)

105) PHILIPP,A.J.: Cholinesterase of leucocytes. Amer. J. Physiol. 184: 145-146 (1956)

106) POLLMANN,W., SCHRAMM,G.: Säurehydrolyse von Ribonucleinsäure und Desoxyribonucleinsäure. Ztschr. Naturforsch. 16b: 573-578 (1961)

107) POLLMANN,W.: V. Viruscolloquium der Deutschen Forschungsgemeinschaft. 21./22. Sept. 1965, Marburg/Lahn

108) POLLMANN,W.: Die Bestimmung kleinster Hämoglobinmengen mit Hilfe der Hämoglobin-Haptoglobin-Peroxydase-Reaktion. Klin. Wschr. 44: 789-790 (1966)

109) POLLMANN,W.: Einfacher Fraktionssammler für die Säulenchromatographie unter sterilen Bedingungen. Acta Medicotechnica 10: 502-505 (1966)

110) POLLMANN,W., QUAST,R.: Enzymtrennungen in der vertikalen Stärkegelelektrophorese. Zschr. Naturforsch. 21b: 589-600 (1966)

111) PONDER,E., Mc.LEOD,J.: The effect of haemolytic substances on white cell respiration. J. Gen. Physiol. 20: 267-269 (1936)

112) RAFTER,G.W., CHEUK,S., KAISER,D., WOOD,W.B.: Studies on the pathogenesis of fever. XIV. Further observations on the chemistry of leucocytic pyrogen.
J. Exper. Med. 123: 433-444 (1966)

113) RAFTER,G.W., COLLINS,R.D., WOOD,W.B.: Preliminary chemical characterization of leucocytic pyrogen.
J. Exper. Med. 111: 831-840 (1960)

114) RAUCH,H.C., LOOMIS,M.E., JOHNSON,M.E., FAVOUR,C.B.: In vitro suppression of polymorphonuclear leucocyte and lymphocyte glycolysis by cortisol.
Endocrinology 68: 375-385 (1961)

115) RECHIGL,M., EVANS,W.H.: Role of catalase and peroxidase in the metabolism of leucocytes.
Nature 199: 1001-1002 (1963)

116) REMMELE,W.: Atmung und Glykolyse der Leukozyten.
Acta haemat. 13: 103-123 (1955)

117) ROSSI,F., ZATTI,M.: Pathway of glucose oxidation in leucocytes.
Exper. Cell Res. 25: 182-183 (1961)

118) ROSSITER,R.J., WONG,E.: Esterase of rabbit polymorphonuclear leucocytes.
J. Biol. Chem. 180: 933-946 (1949)

119) SABARRA,A.J., KARNOSKY,M.L.: The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particle by polymorphonuclear leucocytes.
J. Biol. Chem. 234: 1355-1362 (1959)

120) SCHOLTISSEK,CH., ROTT,R., SCHÄFER,W.: Verhalten von Viren gegenüber dem Bayer-Präparat A 139.
Zschr. Naturforsch. 17b: 222-227 (1962)

121) SCHULTZ,J., KAMINKER,K.: Myeloperoxydase of leucocytes of normal human blood.
Arch. Biochem. Biophys. 96: 465-467 (1962)

122) SCOTT,J.L.: Human leucocytes metabolism in vitro.
Blood 28: 683-691 (1966)

123) SEABRA,P.: Oxidase and lipase of the leucocytes.
Amer. N. J. Head. Sc. 59: 1022-1025 (1955)

124) SEELICH,F.: The metabolism of normal and abnormal leucocytes. In: "The Physiology and Pathology of leucocytes". Edited by H.Braunsteiner and P.Zucker.
New York: Gonne & Stratton 1960, p.152

125) SEELIGMAN,A.M., NACHLASS,M.M.: Lipase. "Methoden der enzymatischen Analyse", H.K. BERGMEYER.
Verlag Chemie 1962: S.776

126) SEVER,J.L.: Application of a microtechnique to viral serological investigation.
J. of Immunol. 88: 320-329 (1962)

127) SHERSTNEVA,O.S.: Dependence of phagocytic activity of leucocytes on respiratory phosphorylation.
Bull. Exper. Med. Biol. 50: 705-709 (1961)

128) SHU,H. . 1967, unveröffentlicht.

129) SHU,H.L., KOHLHAGE,H., POLLMANN,W.: Gleichzeitige Induktion von endogenem Pyrogen und Interferon durch Myxoviren.
Zbl. Bakt. Abt. I. Ref. 206: 113 (1967)

130) SIEGERT,R., POLLMANN,W., SHU,H.L.: Zur chemischen Natur des endogenen, durch Myxoviren induzierten Pyrogens.
Zschr. Naturforsch. 22b: 320-323 (1967)

131) SIEGERT,R., SHU,H.L., POLLMANN,W., MENZEL: Untersuchungen über Viruspyrogene, 1.Mitteilung: Versuche zur Abtrennung des pyrogenen Prinzips von Myxoviren.
Zschr. Naturforsch. 22b: 155-158 (1967)

132) SIEGERT,R., BRAUNE,P.: Viruspyrogene. Colloq. Max-Planck-Institut Virusforschung, Tübingen. 1955

133) SIEGERT,R.: Toxizität und Pyrogenität animaler Viren.
Zbl. Bakt. I. Org. 205: 110-121 (1967)

134) SIEGERT,R., BETZ,E., SCHMIDT,G.: S.B. Ges. Beförd. ges. Naturwissenschaft, Marburg. 83/84, 255-276 (1962)

135) SIEGERT,R., BETZ,E., SCHMIDT,G.: Zur Problematik des endogenen Pyrogenbegriffes, dargestellt am Beispiel der Viruspyrogene.
Festschrift zur 100 Jahrfeier der Farbwerke Höchst 1963

136) SIEGERT,R., BRAUNE,P.: The Pyrogen of Myxoviruses. I. Induction of hyperthermia and its tolerance.
Virology 24: 209-224 (1964)

137) SIEGERT,R., SHU,H.L., KOHLHAGE,H.: Correlation between fever and interferontiter in rabbits after induction with myxoviruses.
Life Sciences 6: 615-620 (1967)

138) SIEGERT,R.: Natur und Wirkungsmechanismus der Virus= pyrogene.
Dtsch. med. Wschr. 1967 817-818

139) SMOLELIS,A.N., HARTSCHELL,S.E.: The determination of lysozyms.
J. Bact. 58: 731-736 (1949)

140) STANE,J.D.; Prevention of Virus infection with an enzyme of V. cholerae.
J. Exper. Med. Sc. 26: 49-53 (1948)

141) STERNHOLM,R.L., NOBLE,E.P.: Carbohydrate metabolism in leucocytes. IV. The metabolism of glucose and galactose in polymorphonuclear leucocytes from rabbits.
J. Biol. Chem. 236: 3093-3096 (1961)

142) STETSON,C.A.: Similareties in the mechanisms determining the arthus and schwartzman phenomena.
J. Exper. Med. 94: 34-58 (1951)

143) STRAUSS,B.S., STETSON,C.A.Jr.: Studies on the effect of certain macromolecular substances on the respiratory activity of the leucocytes of peripheral blood.
J. Exper. Med. 112: 653 (1960)

144) SWENSFIELD,M.E., WRIGTH,P.D., BETHELL,F.H.: Variations in nucleotidase activity of leucocytes studied with leukemia patients.
J. Laborat. Clin. Med. 40: 515 (1952)

145) TRAUTNER,A.: Bakteriophagen: "Virus- u. Rickettsien=infektionen des Menschen" v. R. Haas und O. Vivell, J.F. Lehmann-Verlag München 1965, S.180

146) TRENKNER,E.: Das Verhalten der Hüllproteine des Bak=teriophagen fd während der Infektion.
VI. Viruskolloquium der Deutschen Forschungsgemein=schaft, Sept. 1967: Marburg an der Lahn.

147) TRUBOWITZ,S., FELDMANN,D., MORGENSTERN,S.W., HUNT,V.M.: The isolation, purification and properties of the al-kaline phosphatase of human leucocytes.
Biochem. J. 80: 369-374 (1961)

148) UMBREIT,W.W., BURRIS,R.W., STAUFFER,J.F.: Manometric Techniques.
Burgess Publishing Company IV. 1964

149) VALENTINE,R.C., ISAACS,A.: The structure of influenza virus filaments and spheres.
J. Gen. Microbiol. 16: 195-204 (1957)
16: 680-685 (1957)

150) VRADOK,G.C.: The Physiology of Granulozytic cells in normal and leukemic states.
Amer. J. Med. 28: 699-725 (1960)

151) WAGNER,R., BENNET,J.L. and Le QUIRE,V.S.: The production of fever by influenza viruses. I. Factors influencing the febrile response to single injection of virus.
J. Exper. Med. 90: 321 (1948)

152) WAGNER,R.: Production of fever by influenzal viruses. IV. Tolerance to mumps and influenza pyrogens. Proc. Sbc. Exper. Biol. Med. 83: 612 (1953)

153) WAGNER,R.R., YOURKE,A.: Enzyme studies on white blood cells. IV. Glycolysis of added glucose hexokinase and adenylpyrophosphatase activity. Arch. Biochem. 44: 415-426 (1953)

154) WAGNER,R.R., MEYERRECKS,N., SPORACO,R.: Enzyme studies on white blood cells and platelets. V. Dehydrogenase activity. Arch. Biochem. 61: 278-290 (1956)

155) WARBURG,O., GEWEHN,K., GEISSLER,A.W.: Stoffwechsel der weißen Blutzellen. Zschr. Naturforsch. 13b: 515 (1958)

156) WECKER,E., SCHÄFER,W.: Studien mit P 32-markiertem Virus der klassischen Geflügelpest. Zschr. Naturforsch. 12b: 483-492 (1957)

157) WEISMANN,G.: Studies of lysosomes. VI.: The effect of neutral steroids and bile acids on lysosomes in vitro. Biochem. Pharmacol. 14: 525-535 (1965)

158) WILLIAMS,H.E., FIELD,J.B.: Low leucocyte phosphorylase in hepatic phosphorylase-deficient glycogen storage disease. J. Clin. Invest. 40: 1841-1845 (1961)

159) ZWEIFACH,B.W., JANOFF,A.: Bacterial endotoxemia. Amer. Rev. Med. 816: 201-220 (1965)